Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Untersuchungen über die Wirkung von LHRH 10–6309 auf die Freisetzung von LH aus Rattenhypophysenkulturen und Beeinflussung durch Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
IRENE SCHÄFER
aus Stuttgart

1979

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

Untersuchungen über die Wirkung von LHRH 10–6309 auf die Freisetzung von LH aus Rattenhypophysenkulturen und Beeinflussung durch Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
IRENE SCHÄFER
aus Stuttgart

1979

Dekan: Professor Dr. H. Heimann
Berichterstatter: Professor Dr. S. Heller
(Professor Dr. H. A. Hirsch)

Gedruckt bei Fa. H.-J. Köhler, Reprografischer Betrieb, Vor dem Kreuzberg 25, 7400 Tübingen

In der Arbeit verwandte Abkürzungen:

ACS = Acetylsalicylsäure
ACTH = adrenocorticotropes Hormon
FSH = follikelstimulierendes Hormon
HE = Hypothalamusextrakt
HVL = Hypophysenvorderlappen
LH = luteinisierendes Hormon
LHRH = LH Releasinghormon
PG $F_{2\alpha}$ = Prostaglandin $F_{2\alpha}$

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Zusammenwirken von Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden	1
1.2.	Geschichtlicher Überblick über die Entdeckung der Regelsysteme	3
1.3.	Isolierung, Reinigung, Strukturaufklärung und der Gonadotropin-Releasinghormone	4
1.4.	Weiterführende Versuche mit Rattenhypophysenkulturen	5
1.5.	Strukturformeln und Untersuchungen von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Acetylsalicylsäure	10
2.	Fragestellung der Arbeit	11
3.	Material und Methodik	12
3.1.	Hypophysenkulturen	12
3.2.	LH Nachweis mit Radioimmunoassay	15
3.3.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	16
4.	Ergebnisse	17
5.	Diskussion	72
6.	Zusammenfassung	81
7.	Literaturliste	82

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Bereits vor Jahren wurde in zahlreichen Experimenten mit verschiedenen Tierarten nachgewiesen, daß das Hypophysen-Gonaden-System durch ein übergeordnetes Zentrum, dem Hypothalamus, gesteuert wird. Weitere Untersuchungen ergaben, daß diese Steuerung durch sogenannte Releasinghormone geschieht. Diese konnten im Laufe der Zeit identifiziert, isoliert und synthetisch hergestellt werden.
In der vorliegenden Arbeit wird die Ausschüttung von LH nach Zusatz verschiedener Dosen eines synthetischen Releasinghormons unter Verwendung von Rattenhypophysenkulturen untersucht.
Außerdem wurde geprüft, ob Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ diese Ausschüttung beeinflussen.

1.1. ZUSAMMENWIRKEN VON HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSE-GONADEN

Die Steuerung der Gonadenfunktion erfolgt nach neuesten Erkenntnissen durch drei Regelkreise

a) Ovar $\xrightarrow{1}$ Hypothalamus $\xrightarrow{2}$ HVL $\xrightarrow{3}$ Ovar

b) Ovar $\xrightarrow{1}$ HVL $\xrightarrow{3}$ Ovar

c) HVL $\xrightarrow{3}$ Hypothalamus $\xrightarrow{2}$ HVL

1 = Steroide, 2 = Releasinghormone, 3 = Gonadotropine

zu a) Der Hypothalamus stimuliert über die Abgabe von Releasinghormonen die Ausschüttung von FSH und LH aus der Hypophyse. FSH-RH und LHRH werden über Pfortaderblutgefäße von der Eminentia mediana des Hypothalamus der Pars distalis, dem Hauptteil des Hypophysenvorderlappens, zugeführt (55d). FSH und LH regen die Ovarien zur Bildung

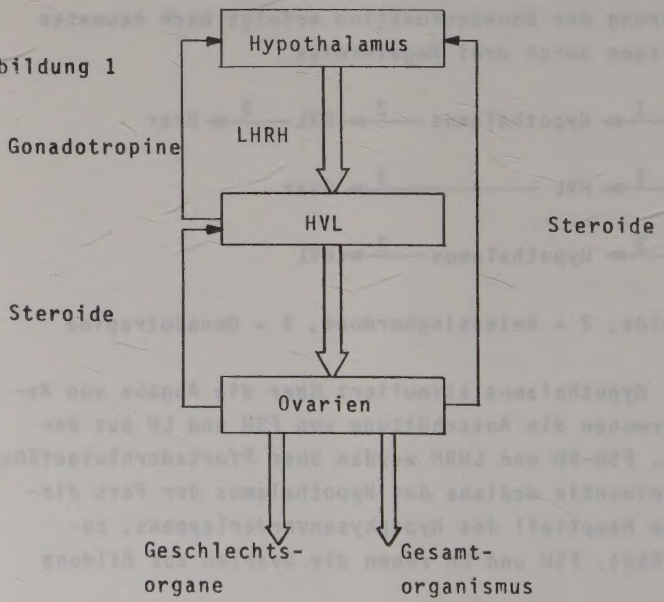
von Östrogen bzw. Progesteron an. Diese wiederum vermögen rückwirkend die Inkretion von FSH/LH-Releasinghormon zu hemmen und daher die Ausschüttung von FSH und LH zu blockieren.

zu b) Studien mit H^3-markierten Steroiden zeigten, daß Östrogene und Progesteron auch direkten Einfluß auf den HVL haben (54).
Unter bestimmten Voraussetzungen, zum Beispiel bei niederen Östrogendosen, können Östrogene eine LH-Ausschüttung im Sinne eines sogenannten positiven Rückkopplungsmechanismus auslösen (13,42,54).

zu c) Dieser Regelkreis wird als Innerer bzw. Selbstrückkopplungsmechanismus bezeichnet, hierbei geht die hemmende Wirkung vom FSH und LH aus.

Obersichtsschema der Regelkreise (vereinfachtes Schema nach HELLER 1972)

Abbildung 1



1.2. GESCHICHTLICHER OBERBLICK OBER DIE ENTDECKUNG DER REGELSYSTEME

1932 stellten HOHLWEG und JUNKMANN nach einigen Untersuchungen die Frage, ob die Rückkopplung zwischen den Ovarien und dem Hypophysenvorderlappen über ein nervöses System erfolge (25). Daß der Hypothalamus ein solches steuerndes Zentrum für die Hypophyse ist bewiesen 1938 WESTMAN und JACOBSOHN (65). Sie durchtrennten in ihren Versuchen den Hypophysenstiel und beließen die Hypophyse, kurze Zeit später stellten sie eine Atrophie der belassenen Hypophyse fest.
Im Verlaufe der Untersuchungen über den genauen Wirkungsmechanismus postulierte HARRIS, G.W., indem er verschiedene Hypothalamusregionen elektrisch stimulierte, eine neurohumorale Reizübertragung zwischen Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen. Er stellte zugleich fest, daß Blut in dem sogenannten Portalgefäßsystem vom Hypothalamus zum Hypophysenvorderlappen fließt (20,21).
Dieses Gefäßsystem konnte dann von TÖRÖK 1954 durch Farbstoffinjektionen an anaesthesierten Tieren in eindrucksvoller Art dargestellt werden (60).
Weitere Versuche wurden dann mit der Verpflanzung von Hypophysengewebe unternommen (22), bis schließlich von HALASZ et al. 1962 (17) gezeigt werden konnte, daß bei Verpflanzung von Hypophysengewebe in den Hypothalamus nur in bestimmten Bezirken des Hypothalamus, nämlich im mittleren basalen Bereich, eine Sekretion erfolgt (17).
Umgekehrt hatten Hypothalamusextrakte einen direkten Einfluß auf das Ausschüttungsverhalten der Hypophyse.
So wurden schließlich nach und nach verschiedene Releasinghormone gefunden. Zunächst entdeckte man durch in vivo und in vitro Untersuchungen (15,46) das für die ACTH-Freisetzung verantwortliche Releasinghormon, das sogenannte corticotrope Releasinghormon (CRH). 1962 wurde dann durch GUILLEMIN das thyreotrope Releasinghormon (TRH) gefunden (16). Noch im selben Jahr berichtete McCANN (34) über ein Releasing-

hormon für das luteinisierende Hormon. Die Versuche von CAMPBELL et al. (4,5) und von NIKITOVITCH-WINER (38), die Injektionen von Eminentia-mediana-Extrakten in den Hypophysenvorderlappen durchführten und dabei eine Ovulation auslösen konnten, bestätigten die Existenz eines LH-Releasinghormons. Über ein FSH-Releasinghormon wurde dann erstmals 1964 von IGARASHI und McCANN berichtet (26).

1.3. ISOLIERUNG, REINIGUNG, STRUKTURAUFKLÄRUNG UND SYNTHESE DER GONADOTROPIN-RELEASINGHORMONE

Zunächst hatte man Releasing-Aktivität in Hypothalamusextrakten von Ratten (35,41), Schafen (27,50), Rind (50, 51a), Kaninchen, Hund (11), Affe (4), Schwein (51b) und Mensch (53b) nachgewiesen.
Das nächste Ziel war nun dieses Releasinghormon zu isolieren, reinigen und seine Struktur aufzuklären.
Die Aufbereitung des LH-Releasinghormons (12,43,52,53a) erfolgte durch Gel-Filtration (Sephadex-G 25), Phenolextraktion, Chromatographie und Rechromatographie auf Carboximethyl-Cellulose und Säulenelektrophorese. Durch die Phenolextraktion wurden Salze und andere Materialien entfernt. Der Vasopressinanteil wurde durch die Chromatographie fast vollständig entfernt. Die Molekulargewichte von FSH-RH und LHRH wurden auf 1000 bis 2000 geschätzt, somit nur unwesentlich höher als die von Vasopressin und Oxytocin (8,55c). Späterere Erkenntnisse brachten jedoch auch Vermutungen über ein Molekulargewicht unter 600 (66).
Zunächst wurde dann der Peptidcharakter des Releasinghormons bewiesen (55c), dabei stellte man fest, daß bei Zugabe von Endopeptidasen (Chymotrypsin, Papain, Thermolysin) zum Inkubationsmedium die Aktivität von FSH-RH und LHRH aufgehoben werden konnte, wohingegen die Zugabe von Exopeptidasen (Leucinaminopeptidase, Aminopeptidase M, Carboxypeptidase A und B) keinen Einfluß auf die Aktivität des Releasinghormons hatten (55d).

Mit diesen vielen mühsamen Einzelschritten gelang es dann SCHALLY die Aminosäurensequenz des Releasinghormons aufzuklären. Es handelte sich um ein Dekapeptid mit folgender Aminosäurenreihenfolge:

PyroGlu-His-Try-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH_2

Nachdem SCHALLY diese Reihenfolge des Releasinghormons gefunden hatte, versuchte er in umgekehrter Reihenfolge dieses Hormon synthetisch herzustellen. Diese Synthese gelang jedoch einer Forschergruppe der Farbwerke Hoechst unter GEIGER als erste (14). Das synthetische Releasinghormon entsprach in seiner biologischen Wirksamkeit dem von SCHALLY aus Schweinehypothalami isolierten natürlichen Releasinghormon. In vielen Versuchen wurden natürliches und synthetisches Releasinghormon miteinander verglichen und jeweils identische Ergebnisse gewonnen (45,48).
Erstaunlich war nun, daß mit diesem Dekapeptid sowohl eine LH wie auch eine FSH Ausschüttung erzielt werden konnte. Es fragte sich nun, handelt es sich hier um eine Verunreinigung zweier verschiedener Releasinghormone, oder aber ist nur ein einziges Releasinghormon für die Ausschüttung von LH und FSH verantwortlich (55c,d).
SCHALLY versuchte zunächst durch Elektrophorese (8), später durch zahlreiche weitere Reinigungsschritte das FSH-RH vom LHRH abzutrennen (32). Er kam zu dem Ergebnis, daß nur ein einziges Releasinghormon für die physiologische Regulation von FSH und LH verantwortlich ist (55a).

1.4. WEITERFOHRENDE VERSUCHE MIT RATTENHYPOPHYSENKULTUREN

a) Kann das Releasinghormon neben einem Release auch eine Neusynthese von LH und FSH bewirken?

Es wurde von einigen Autoren immer wieder die Frage diskutiert, ob das Releasinghormon neben einer Freisetzung auch eine Synthese von FSH und LH bewirken könne.

SCHALLY konnte dies nachweisen durch Zugabe von tritiummarkiertem Glucosamin zum Inkubationsmedium, das sich dann im LH wiederfand (45). Auch MITTLER konnte eine Synthese nachweisen. Er kultivierte drei Tage lang Rattenhypophysen und setzte zweimal täglich Releasinghormon hinzu. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen erfolgte eine quantitativ höhere Ausschüttung (36). Auch Versuche anderer Autoren konnten dies bestätigen (47a). Durch Versuche mit Puromycin und Actinomycin, beides Hemmstoffe der Proteinsynthese, konnte die Wirkung des Releasinghormons vermindert werden (28,29, 64). Zur Diskussion stand, ob es sich hierbei um eine Blokkierung der Neusynthese von LH und FSH handelt, oder ob ein Eingriff in ein Enzymsystem vorliegt, das für den Gonadotropinrelease verantwortlich ist (29).

b) Beeinflußung der LHRH Aktivität durch verschiedene Substanzen. Neben einer Hemmung bzw. Förderung des Release wurden Substanzen entdeckt, die selbst einen unspezifischen Release auslösen können.
Einen kurzen Oberblick zeigt folgende Tabelle (entnommen aus HELLER 1972).

Tabelle 1 Substanzen, die einen Gonadotropin Release aus der Hypophyse bewirken:

Substanz	Dosis in µg	Versuchstier	Applikationsart	Wirkung	Autoren
Adrenalin	1/100	Kaninchen	intrahypophyseal	4 von 17 Ovulation	MARKEE et al 1948
	1/1000	Kaninchen	intrahypophyseal	5 von 10 Ovulation	MARKEE et al 1948
	50	Kaninchen	intraventrikulär	4 von 10 Ovulation	SAWYER 1952
	5	Ratten	i.v.	LH-Release	RAMIREZ et 1963
	120	Kaninchen	intrahypophyseal	2 von 11 Ovulation	CAMPBELL et 1964
	40	Ratten	i.v.	LH-Release	MARTINI et al. 1961

Fortsetzung Tabelle 1

Substanz	Dosis in µg	Versuchstier	Applikationsart	Wirkung	Autoren
Noradrenalin	50	Kaninchen	intraventrikulär	4 von 10 Ovulation	SAWYER 1952
Acetylcholin+Prostigmin	10 + 5	Ratten	intrahypophyseal	LH-Release	TAUBENHAUS et al. 1941
	50 + 40	Ratten	s.c.	2 von 10 Pseudopregnancy	TAUBENHAUS et al. 1941
Acetylcholin	5	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965
	10	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965
Carbamylcholin	5	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965
Histamin	250 -500	Kaninchen	intraventrikulär	LH-Release	SAWYER 1955
	120	Kaninchen	intrahypophyseal	LH-Release	CAMPBELL et al. 1964
	5000	Ratten	i.v.	LH-Release	McCANN et al. 1960
	15	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965
Serotonin	35	Ratten	i.v.	LH-Release	McCANN et al. 1960
	50	Ratten	i.v.	LH-Release	GUILIANI et al. 1961
Lysin-Vasopressin	16 IU	Kaninchen	i.v.	Erhöhung der Gonadotropinausscheidung im Urin	MARTINI et al. 1959
Pitressin	16 IU	Kaninchen	i.v.		
	70 mU	Ratten	i.v.	LH-Release	McCANN et al. 1960
	300	Ratten	i.v.	LH-Release	GUILIANI et al. 1961
	200 mU	Ratten	i.v.	LH-Release	RAMIREZ et al. 1963
	1000 mU	Ratten	i.v.	LH-Release	RAMIREZ et al. 1963
Lysin-Vasopressin	5 mU	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965

Fortsetzung Tabelle 1

Substanz	Dosis in µg	Versuchstier	Applikationsart	Wirkung	Autoren
Pitocin	16 mU	Kaninchen	i.v.	Erhöhung der Gonadotropinausscheidung im Urin	MARTINI et al. 1959
Syntocinon	16 mU	Kaninchen	i.v.		
Oxytocin	20 mU	Kaninchen	intrahypothalam	LH-Release	ENDRÖCZI et al. 1965
			FSH-Release		
Histamin	20	Ratten	i.c.	FSH-Release	SAITO et al. 1967
Vasopressin	500 mU	Ratten	i.c.	FSH-Release	
Spermidine	10	Ratten	i.c.	FSH-Release	
			Andere Substanzen		
Picrotoxin	1500	Kaninchen	i.v.	2 von 14 Ovulation	KASDON 1949
	1500 -2000	Kaninchen	i.v.	50% Ovulation	SAWYER et al. 1950
Kupferacetat	10000	Kaninchen	i.v.	Ovulation	SAWYER et al. 1950
	150	Kaninchen	intrahypophyseal	Ovulation	SAWYER et al. 1950
Kupfergluconat	4mg/kg	Kaninchen	i.v.	Ovulation	SUZUKI et al. 1964 a
Kupfersulfat	4mg/kg	Kaninchen	i.v.	Ovulation	SUZUKI et al. 1964 b
	50mg	Kaninchen	Implantation in Eminentia mediana	Ovulation	HIROI
	10mg	Kaninchen	i.v.	Ovulation	KOBAYASHI et al. 1965

Fortsetzung Tabelle 1

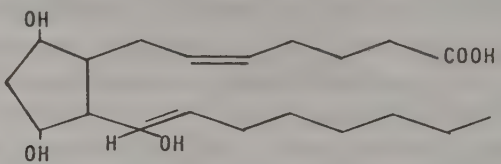
Substanz	Dosis in µg	Versuchtier	Applikationsart	Wirkung	Autoren
	10mg	Kaninchen	i.v.	Ovulation	KOBAYASHI et al. 1965
	1/660 der i.v. Dosis	Kaninchen	intraventrikulär	Ovulation	KOBAYASHI et al. 1965
	1/30-1/60 der i.v. Dosis	Kaninchen	intravertebral	Ovulation	KOBAYASHI et al. 1965
	3mg/kg	Kaninchen	i.v.	Ovulation	SUZUKI et al. 1965

Neben einer Untersuchung von Stoffen, die selbst einen unspezifischen Release verursachten, war es von großem Interesse den genauen Wirkungsmechanismus der Releasinghormone bezüglich der Freisetzung von FSH und LH zu erforschen. Zunächst wurde ein Einfluß des Releasinghormons auf die Zellmembran der Hypophysenzelle angenommen. SAMLI und GESCHWIND (47b) berichteten von einer erhöhten LH Freisetzung bei Anreicherung von Kaliumionen im Inkubationsmedium. Diesen Effekt wiesen bereits DOUGLAS und POISNER am Hypophysenhinterlappen nach (9). Weitere Versuche konnten einen additiven Effekt zwischen hoher Kaliumkonzentration und Releasinghormon bestätigen (62).
Einen anderen Angriffspunkt fanden WAKABAYASHI und McCANN, indem sie durch radioaktive Markierungen eine Erhöhung der Glucoseoxidation nach Zugabe von Hypothalamusextrakt zum Inkubationsmedium fanden. Sie schlußfolgerten eine Beteiligung der Releasinghormone am Kohlenhydratstoffwechsel der Hypophysenvorderlappenzelle, wahrscheinlich über Vermittlung des zyklischen AMP (63).

1.5. STRUKTURFORMELN UND UNTERSUCHUNGEN VON PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ UND ACETYLSALICYLSÄURE

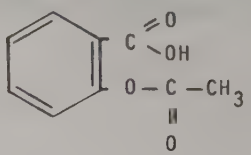
Zur Fragestellung innerhalb dieser Arbeit gehörte unter anderem die Beeinflußbarkeit der Gonadotropinsekretion durch Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Acetylsalicylsäure.
Die Prostaglandine üben auf die Gonaden einen luteolytischen Effekt aus, den man sich als lokalen Effekt vorstellte (40). Weitere Versuche erbrachten auch eine zentrale Wirkung auf die Hypophyse, die entweder direkt über die Hypophyse oder indirekt über den Hypothalamus geschieht.
Man fand, daß der LH Gehalt im Serum bei mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ behandelten Ratten weit über dem der Kontrollgruppen lag (30). McCANN injizierte Prostaglandine in den dritten Ventrikel von ovarektomierten Ratten und erhielt damit einen signifikanten Anstieg von LH im Plasma (18). In weiteren Versuchen vertrat er die Auffassung, daß die Wirkung der Prostaglandine auf den LH Release mit dem zyklischen AMP zusammenhängt. Prostaglandine erhöhen die Adenyl-Zyklase-Aktivität, so daß ein erhöhter Spiegel des zyklischen AMP daraus resultiert (67). Von einer LH Ausschüttung durch zyklisches AMP und Theophyllin berichtete RATNER (44).
Strukturformel von Prostaglandin $F_{2\alpha}$:

Abb. 2



Als Hemmer der Prostaglandinsynthese stellten sich Polyphloretin-Phosphat, Indomethazin und vor allem die in dieser Arbeit verwandte Acetylsalicylsäure heraus (10,61).
Strukturformel der Acetylsalicylsäure:

Abb. 3



2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche mit kultivierten Rattenhypophysen, unter Zugabe des synthetischen LHRH 10-6309 (Fa. La Roche, Basel) und von Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$, durchgeführt.
Es stellten sich folgende Fragen:

1) Findet sich nach Zugabe von LHRH unter den jeweiligen Versuchsbedingungen eine konzentrationsabhängige Förderung oder Hemmung der LH-Ausschüttung?

2) Gibt es Hinweise auf eine Neusynthese von LH unter der Zugabe von LHRH 10-6309?

3) Kinetische Studie der LH-Ausschüttung

4) Hat Acetylsalicylsäure + LHRH 10-6309 und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ allein und in Kombination mit LHRH 10-6309 einen Einfluß auf die LH-Ausschüttung?

3. MATERIAL UND METHODIK

3.1. HYPOPHYSENKULTUREN

Der Ansatz der Hypophysenkulturen erfolgte nach einer Modifikation der Methode von A.V.SCHALLY (45).

Verwandte Materialien

1) Hypophysen von weiblichen Wistar-Ratten;
   Gewicht 150-170 g (Versuchsanstalt Ivanovas, Kissleg Allgäu

2) TCM 199
   (Difco Laboratories Detroit, Michigan USA)

3) TC Bicarbonate Solution 10%
   (Difco Laboratories Detroit, Michigan USA)

4) Binotal
   (Bayer Leverkusen)

5) Acetylsalicylsäure g 4600 E
   (Bayer Leverkusen)

6) LHRH 10-6309
   (La Roche, Basel)

7) Prostaglandin $F_{2\alpha}$
   (The Upjohn Company of Canada, Michigan Ontario)

8) Sterile physiologische NaCl 0,9%

Herstellung der Arbeitslösungen

1) TCM Herstellung
Die Zubereitung erfolgte nach der Gebrauchsanweisung.

2) Herstellung der Binotal-Lösung
Als Lösungsmittel verwandte man TCM 199. Es wurden pro 1 ml Medium 0,0001 g Binotal zugesetzt.

3) LHRH 10-6309
Die Lösung der Substanz erfolgte in TCM 199.
Folgende Konzentrationen wurden hergestellt:
0,5 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,5 µg/ml LHRH.

4) Acetylsalicylsäure
Die Lösung wurde ebenfalls in TCM 199 durchgeführt und zwar in folgenden Dosierungen:
1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml.

5) Prostaglandin $F_{2\alpha}$
Die Verdünnung der Ausgangslösung (1 ml = 5 mg) erfolgte mit TCM 199. Es wurden Konzentrationen von 0,01 mg, 0,1 mg und 0,5 mg Prostaglandin $F_{2\alpha}$ hergestellt.

Methodik

Die Züchtung der Hypophysen erfolgte modifiziert nach REDDING, SCHALLY et al. (45).
Im Gegensatz zu diesen wurde TCM 199 ohne Kälberserum verwandt, da die Zellen nicht wegen des Wachstums kultiviert wurden, sondern um kontrollierbare Hormonmengen zu erhalten. Als Antibiotikum setzte man Binotal anstelle von Streptomycin und Penicillin zu.
Mit Ausnahme von Versuch 1 wurde täglich neues Medium zugefügt.

Um eine größere Sterilität zu erreichen, kultivierte man im Gegensatz zu REDDING, SCHALLY et al. (45) jeweils nur eine Hypophyse in einem Erlenmeyerkolben.

Kulturansatz

Die Ratten wurden anaesthesiert, entblutet und die Hypophysen steril herauspräpariert. Danach zerschnitt man jede Hypophyse auf einem Uhrglas in TCM 199 in möglichst kleine Teile, um eine große Oberfläche zu erhalten. Mit einer sterilen Nasenpipette brachte man die einzelnen Hypophysenteilchen in einen 50 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 5 ml sterilem Medium.
Je nach Versuch wurde den Kulturen verschiedene Dosen des LHRH, der Acetylsalicylsäure oder des Prostaglandins $F_{2\alpha}$ zugesetzt. Den Kontrollgruppen fügte man keine weitere Substanz zu.
Es erfolgte Begasung der Kulturkölbchen mit 2 ml 95 %igem O_2 und 5 %igem CO_2. Die Kulturen wurden mit sterilen Gummistopfen verschlossen und je nach Versuchsbedingungen verschieden lange bei 36,5°C im Inkubator aufbewahrt. Bei Bedarf wurde nachbegast (Indikatorzusatz im Medium).

Mediumwechsel

Das Medium wurde mit einer sterilen Einmalspritze und einer sterilen Einmalkanüle abgezogen und zur späteren radioimmunologischen Messung in Teströhrchen eingefroren (Material Polystyrol; Fa. Walter Sarstedt). Den Kulturen wurde die entsprechende Menge neues Medium zugrfügt, je nach Versuchsanordnung auch erneuter Zusatz von LHRH.
Der Kulturabbruch erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie der Medienwechsel.

3.2. LH NACHWEIS

Der Nachweis von LH wurde im Radioimmunoassay nach der Methode von NIAMID (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland) durchgeführt.

Materialien

Folgende Substanzen wurden von THE NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS, METABOLISM AND DIGESTIVE DISEASES (NIAMID) RAT PITUITARY HORMONE DISTRIBUTION PROGRAM freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

1) Ratten-luteinisierendes-Hormon für die Jodierung NIAMID-Rat LH-I-1
2) Ratten-luteinisierender-Hormon-Standard (Referenzaufbereitung) für Radioimmunoassay NIAMID-Rat LH-RP-1
3) Anti-Ratten LH Serum (Kaninchen) für Radioimmunoassay NIAMID-A-Rat LHS-1

Zusätzlich verwandt wurden:

Ein zweiter Antikörper = Anti-Kaninchen Gammaglobulin von Ziegen (Fa. Calbiochem, California)
Puffersubstanzen bestehend aus:
Na_2HPO_4 und NaCl (Fa. Merck)
Merthiolate (Fa. Serva)
KH_2PO_4 und EDTA (Fa. Merck)
Normal Rabbit Serum (Wellcome)
zur Jodierung J^{125} bzw. NaJ^{125} Lsg. (Fa. Amersham Buchler, Frankfurt)

Die Jodierung erfolgte mit Hilfe der Chloramin-T-Methode (Greenwood und Mitarb. 1963). Die Herstellung der Arbeitslösungen und der eigentliche Ansatz des Radioimmunoassay wurde nach der Anweisung von NIAMID durchgeführt.

3.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Nach Ermittlung der Mittelwerte und der betreffenden Standardabweichungen erfolgten die Signifikanzberechnungen mit Hilfe des t-Testes nach Student.
Dabei wurde die Kontrollgruppe gegen die einzelnen Versuchsgruppen verglichen bzw. umgekehrt, wenn die Kontrollgruppe die höheren Werte aufwies. Zusätzlich wurde die Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen berechnet.
Der P-Wert wurde anhand des errechneten t-Wertes und den betreffenden Freiheitsgraden in den Wissenschaftlichen Tabellen, Documenta Geigy (7. Aufl. Basel 1973) nachgeschlagen.

Zur Erläuterung:
- bedeutet keine Signifikanz; P-Wert größer als 0,05
\+ bedeutet signifikant; P-Wert zwischen 0,05 und 0,01
++ bedeutet hoch signifikant; P-Wert zwischen 0,01 und 0,0005

4. ERGEBNISSE

Versuch 1

Die Versuchsgruppe umfaßte 20 steril herauspräparierte Rattenhypophysen.
Der Versuchsansatz erfolgte wie bereits angegeben (Aufbewahrung jeder Hypophyse in einem 50 ml Erlenmeyerkolben mit 5 ml TCM, Zugabe von Releasinghormon und Binotal, Begasung).
Es wurden vier Gruppen gebildet, ein Leerwert (ohne LHRH) und drei weitere Gruppen, denen jeweils 0,5 µg/ml, 1,5 µg/ml und 2,5 µg/ml LHRH zugesetzt wurden.
Der Kulturabbruch erfolgte nach fünf Tagen. Es hatte kein Medienwechsel stattgefunden.

Der Versuch 1 sollte dazu dienen, die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen von zugesetztem LHRH auf das Ausschüttungsverhalten der Hypophysen aufzuzeigen.
Es wurde die LH Ausschüttung über fünf Tage bestimmt.
Bei allen drei zugefügten LHRH Konzentrationen läßt sich eine gegenüber dem Leerwert deutliche Steigerung der LH Ausschüttung feststellen. Eine signifikante dosisabhängige Zunahme des LH Release erfolgt bis zur Konzentration von 1,5 µg/ml.
Setzt man den Leerwert mit insgesamt 727 ng/ml = 100%. so findet man bei der LH Konzentration von 0,5 µg/ml eine Zunahme der LH Ausschüttung um 96% (insgesamt 196%), die sich bei der Konzentration von 1,5 µg/ml noch weiter auf 110% (insgesamt 210%) steigert.
Weitere Steigerung der LHRH Dosis auf 2,5 µg/ml führt gegenüber der vorigen Konzentration zu einer Abnahme der LH Ausschüttung wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, jedoch liegt auch dieser Wert mit 29% (insgesamt 129%) noch deutlich über dem Kontrollwert.

Versuch 1 Tabelle 2

	Leerwert	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml LHRH
ng/ml	1004	1509	921	673
	1100	2052	2723	1041
	407	1264	2012	1216
	643	1072	1309	1329
	482	1234	670	433
$\bar{x}$	727	1426	1527	939
s	± 310	± 383	± 839	± 377
$\bar{x}$ in %	100	196	210	129
s in %	42,64	52,68	115,40	51,85

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle am fünften Tag

0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml LHRH
++	+	-

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

0,5/1,5 µg	0,5/2,5 µg	1,5/2,5 µg LHRH/ml
-	+	-

Prozentuale LH-Ausschuttung über 5 Tage (Leerwert = 100%)

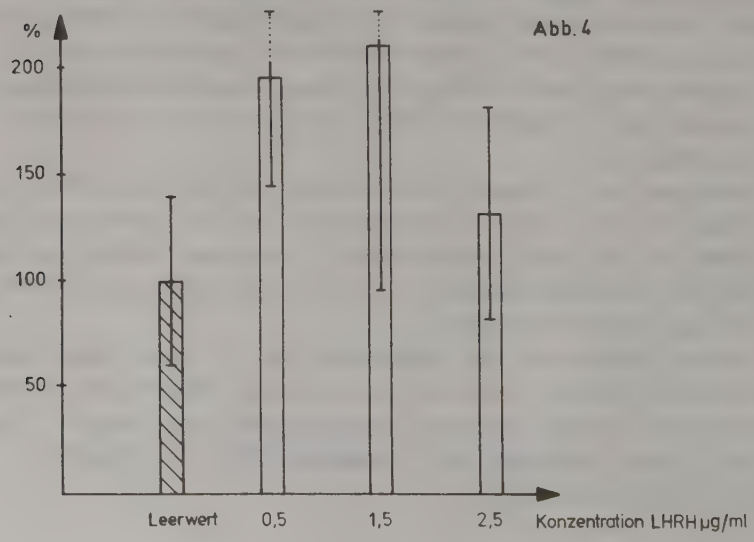


Abb. 4

Versuch 2

Wie im vorigen Versuch wurden vier Gruppen gebildet, eine Kontrollgruppe ohne LHRH Zusatz, sowie drei Gruppen mit LHRH Zusatz und zwar in den Konzentrationsstufen 0,5 µg LHRH/ml, 1,5 µg LHRH/ml und 2,5 µg LHRH/ml.
Die Messungen wurden nach fünf Tagen beendet.
Im Gegensatz zu Versuch 1 fand bei diesem Versuch ein täglicher Medienwechsel statt, d.h. jeden Tag Abzug des gesamten Mediums vom Vortag und die Bestimmung der freigesetzten LH Menge. Danach wurden jeden Tag erneut LHRH in entsprechender Konzentration und frisches Medium zugesetzt.

Da im Versuch 1 nur eine Gesamtsumme über fünf Tage bei einmaliger Zugabe von LHRH gebildet wurde, sollte nun dieser Versuch das Ausschüttungsverhalten der Hypophysen bei täglicher Messung der LH Ausschüttung und täglicher Zugabe von LHRH aufzeigen.
Addiert man die täglichen Ausschüttungen der einzelnen Versuchsgruppen über fünf Tage, so erhält man beim Leerwert 3048 ng/ml, bei der Konzentrationsstufe 0,5 µg/ml 3968 ng/ml, bei 1,5 µg/ml 3082 ng/ml und bei 2,5 µg/ml 2555 ng/ml.
Setzt man den Leerwert als 100%, so ergibt sich bei der LHRH Konzentration 0,5 µg/ml eine Steigerung von 94% (total 194%). Die Konzentrationsstufe mit LHRH 1,5 µg/ml zeigt die gleiche Gesamtausschüttung wie der Leerwert nämlich 3082 ng/ml entsprechend 101% Totalausschüttung.
Die Konzentrationsstufe LHRH 2,5 µg/ml schüttet über fünf Tage weniger aus als die Leerwertsgruppe nämlich 2555 ng/ml entsprechend 84% Totalausschüttung bezogen auf den Leerwert.

Vergleicht man nun die absolute Ausschüttung an jedem einzelnen Versuchstag innerhalb der Versuchsgruppen, so stellt man am ersten Versuchstag die höchste Ausschüttung fest, danach erfolgt ein kontinuierlicher Abfall.
Mit 2224 ng/ml setzt die Leerwertsgruppe die höchste Tagesmenge zu Versuchsbeginn frei.

Schon am zweiten Versuchstag jedoch wird in der Leerwertsgruppe weniger ausgeschieden als in den drei Gruppen mit täglich zugesetztem LHRH. Vom 2.-5. Versuchstag schüttet die Gruppe mit der Konzentration 0,5 µg/ml LHRH am meisten LH aus (2.Tag 691 ng LH/ml, 3.Tag 526 ng LH/ml, 4.Tag 494 ng LH/ml, 5.Tag 167 ng LH/ml).
Interessant erscheint noch die prozentuale Ausschüttung von LH bezogen auf die jeweilige Gesamtmenge innerhalb der Versuchsgruppen und für jeden einzelnen Tag betrachtet zu sein. So schüttet zum Beispiel die Leerwertsgruppe, setzt man die Summe der Ausschüttung über fünf Tage = 100%, am ersten Tag 73% der Gesamtmenge aus. Danach erfolgt ein Abfall der Ausschüttung auf 17%, um am 4. und 5.Tag noch 1-2% zu betragen.
Innerhalb der Versuchsgruppen mit zugesetztem LHRH hingegen wird am ersten Tag prozentual weniger ausgeschieden, jedoch ist deutlich festzustellen, daß die Ausschüttung vom 2.-5. Tag prozentual wesentlich höher liegt als dies bei der Leerwertsgruppe der Fall ist. Die Versuchsgruppe mit täglich zugesetztem LHRH in der Konzentration 2,5 µg/ml setzt z.B. am 5.Tag noch 11% der Gesamtausschüttung frei, zu diesem Zeitpunkt findet sich in der Leerwertsgruppe nur noch eine Freisetzung von 2%.

Versuch 2 Tabelle 3

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2321	524	313	18	100
	2139	582	176	43	97
	2534	662	140	40	66
	2013	271	205	75	42
	2113	510	181	44	31
$\bar{x}$	2224	510	203	44	67
s	± 206	±146	± 66	±20	±31
	Gesamtsumme = 3048 = 100%				
$\bar{x}$ in %	72,96	16,73	6,66	1,44	2,2
s in %	6,75	4,73	2,16	0,65	1,01

0,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2386	661	454	439	201
	2036	707	829	445	146
	1796	723	444	739	137
	2077	613	405	446	176
	2155	751	502	402	173
$\bar{x}$	2090	691	526	494	167
s	± 213	± 55	±172	±138	± 26
	Gesamtsumme = 3968 = 100%				
$\bar{x}$ in %	52,67	17,4	13,25	12,44	4,2
s in %	5,36	1,38	4,33	3,47	0,65

Versuch 2 Tabelle 3

1,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	1669	958	563	457	218
	1173	505	381	253	149
	1453	625	441	224	139
	1521	859	602	258	112
	1811	760	582	318	169
$\bar{x}$	1525	741	514	302	158
s	± 241	±180	± 98	± 93	± 40
	Gesamtsumme = 3082 = 100%				
$\bar{x}$ in %	49,48	24,0	16,6	9,8	5,1
s in %	7,81	5,8	3,1	3,0	1,2

2,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	930	708	366	193	126
	979	716	359	311	272
	1099	1031	559	257	240
	1592	503	373	464	482
	1231	445	476	180	239
$\bar{x}$	1166	681	427	281	271
s	± 265	±230	± 88	±115	±130
	Gesamtsumme = 2555 = 100%				
$\bar{x}$ in %	45,63	26,6	16,7	11,0	10,6
s in %	10,37	9,0	3,4	4,5	5,0

Versuch 2 Tabelle 3

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	9,2	27,6	32,5	45,4	46,2
0,5 µg LHRH	94	135	259	1122	249
s in %	9,5	10,7	84,7	313	38,8
1,5 µg LHRH	68	145	253	686	235
s in %	10,8	35,2	48,2	211	59,7
2,5 µg LHRH	52	135	200	638	404
s in %	11,9	45	43,3	261	194

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH	1,5 µg LHRH	2,5 µg LHRH
100	131	101	84

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml
1.Tag	-	++	++
2.Tag	+	+	+
3.Tag	++	++	++
4.Tag	++	++	++
5.Tag	++	++	++

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	0,5/1,5 µg	0,5/2,5 µg	1,5/2,5 µg
1.Tag	++	++	+
2.Tag	-	-	-
3.Tag	-	-	-
4.Tag	+	+	-
5.Tag	-	+	+

Versuch 2

Prozentuale LH-Ausschüttung

(Gesamtausschüttung über 5 Tage = 100 %)

Abb. 5

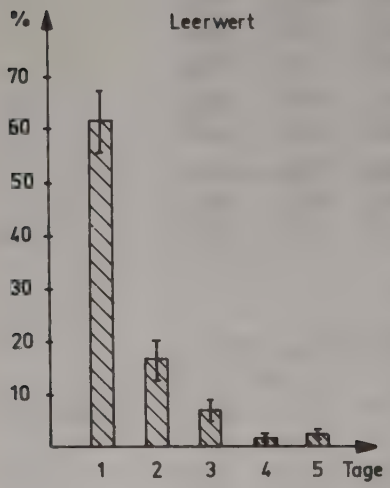


Abb. 6

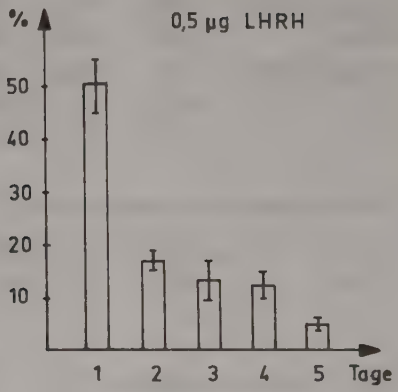


Abb. 7

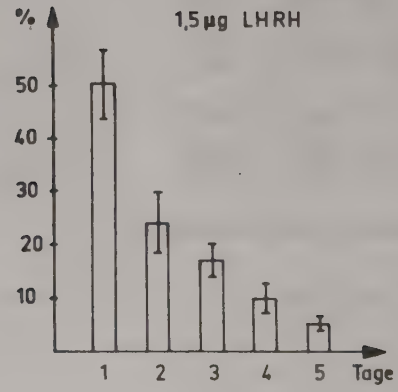
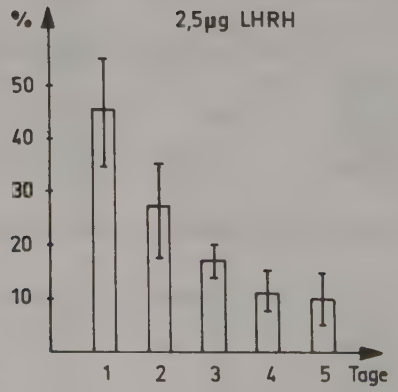


Abb. 8



Versuch 2

Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert = 100 %)

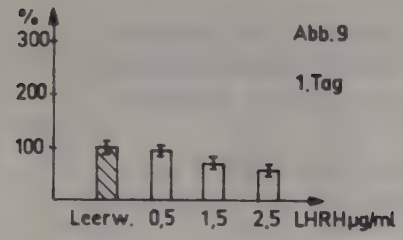


Abb. 9

1. Tag

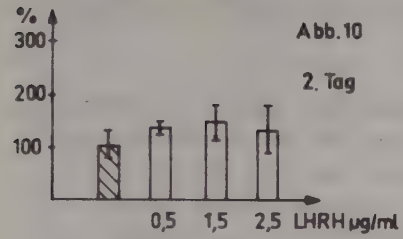


Abb. 10

2. Tag

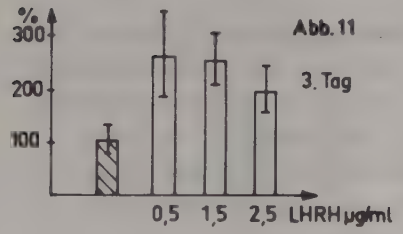
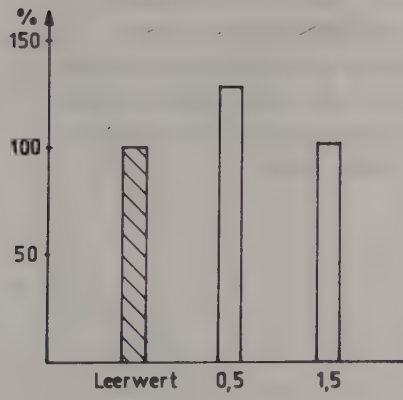


Abb. 11

3. Tag



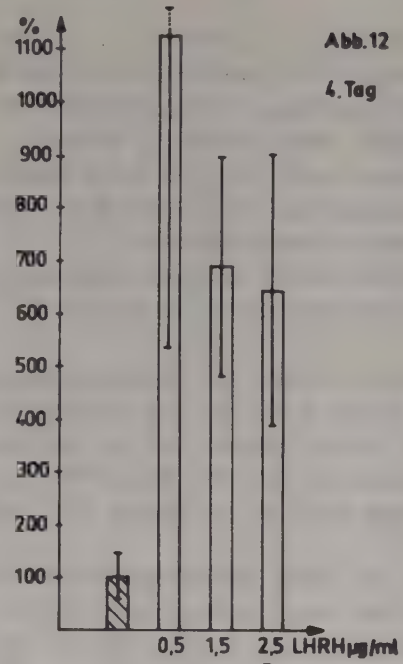


Abb. 12

4. Tag

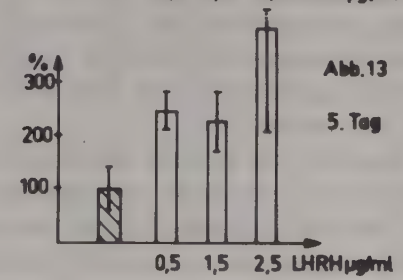


Abb. 13

5. Tag

Prozentuale LH-Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert = 100 %)

Abb. 14

Versuch 3

Im Gegensatz zu Versuch 2, bei dem täglich LHRH zugegeben wurde, sollte nun in Versuch 3 das Ausschüttungsverhalten der Hypophysen bei kontinuierlicher Verdünnung des zugegebenen LHRH untersucht werden.
Hierbei wurde täglich das gesamte Medium bis auf 1 ml abgezogen und neues Medium aber ohne LHRH bis zum ursprünglichen Volumen zugesetzt.
Die verwandten Konzentrationsbereiche und die Versuchsdauer entsprachen denen von Versuch 2.

Vergleicht man die Gesamtausschüttung über fünf Tage addiert, so findet man, daß die Versuchsgruppe mit der Konzentration von 1,5 µg LHRH/ml und 2,5 µg LHRH/ml deutlich weniger LH ausschütten als die Kontrollgruppe (Kontrollgruppe 100%, Gruppe mit 1,5 µg LHRH/ml 37%, Gruppe mit 2,5 µg LHRH/ml 47%).
Nur die Versuchsgruppe bei der Konzentration von 0,5 µg LHRH/ml setzt geringfügig mehr LH frei als die Kontrollgruppe.
Betrachtet man die tägliche LH Ausschüttung, so stellt man fest, daß wiederum wie in Versuch 2 am ersten Tag in allen Versuchsgruppen die höchste Ausschüttung stattfindet (Kontrollgruppe 73%, 0,5 µg LHRH/ml 75%, 1,5 µg LHRH/ml 60%, 2,5 µg LHRH/ml 59%).
Am zweiten Tag erfolgt ein deutlicher Abfall der Ausschüttung, die prozentuale Ausschüttung bewegt sich zwischen 16 -25%. Am dritten Versuchstag findet man nur noch bei der höchsten Konzentration von 2,5 µg LHRH/ml eine nennenswerte Freisetzung, wahrscheinlich eine Folge der trotz ständiger Verdünnung noch übrig gebliebenen LHRH Menge.

Versuch 3 Tabelle 4

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2321	524	313	18	100
	2139	582	176	43	97
	2534	662	140	40	66
	2013	271	205	75	42
	2113	510	181	44	31
$\bar{x}$	2224	510	203	44	67
s	± 206	±146	± 66	±20	±31
	Gesamtsumme = 3048 = 100%				
$\bar{x}$ in %	72,96	16,73	6,66	1,44	2,2
s in %	6,75	4,79	2,16	0,6	1,0

0,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2023	462	60	46	42
	2607	592	68	139	88
	2544	539	136	57	57
	2378	573	182	106	43
	2036	535	112	83	46
$\bar{x}$	2318	540	112	86	55
s	± 276	± 50	± 58	± 38	±20
	Gesamtsumme = 3111 = 100%				
$\bar{x}$ in %	74,5	17,35	3,6	2,76	1,76
s in %	8,8	1,6	1,8	1,2	0,6

Versuch 3 Tabelle 4

1,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	520	196	41	49	66
	676	273	48	77	56
	689	313	79	60	70
	1068	323	56	71	56
	427	261	24	108	31
$\bar{x}$	676	273	49	73	56
s	± 283	± 58	±20	± 23	±17
	Gesamtsumme = 1127 = 100%				
$\bar{x}$ in %	59,98	24,22	4,34	6,47	4,36
s in %	25,11	5,14	1,77	2,04	1,5

2,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	907	248	173	37	41
	757	305	114	29	47
	1004	340	88	39	40
	736	566	106	53	99
$\bar{x}$	851	365	120	40	57
s	± 127	±140	± 37	±10	±28
	Gesamtsumme = 1433 = 100%				
$\bar{x}$ in %	59,38	25,47	8,37	2,79	3,97
s in %	8,86	9,76	2,58	0,69	1,95

Versuch 3 Tabelle 4

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	9,2	27,6	32,5	45,4	46,2
0,5 µg LHRH	104	105	55	195	82
s in %	12,4	9,8	28,5	86,4	29,8
1,5 µg LHRH	30	53,5	24	165	83
s in %	12,7	11,3	9,8	52,2	25,3
2,5 µg LHRH	38	71	59	91	85
s in %	5,7	27,4	18,1	22,7	41,7

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH	1,5 µg LHRH	2,5 µg LHRH
100	100	37	47

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml
1.Tag	-	++	++
2.Tag	-	++	+
3.Tag	+	++	+
4.Tag	+	+	-
5.Tag	-	-	-

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	0,5/1,5 µg	0,5/2,5 µg	1,5/2,5 µg
1,Tag	++	++	-
2.Tag	++	+	-
3.Tag	+	-	++
4.Tag	-	+	++
5.Tag	-	-	-

Versuch 3

Prozentuale LH-Ausschüttung

(Gesamtausschüttung über 5 Tage = 100 %)

Abb.15

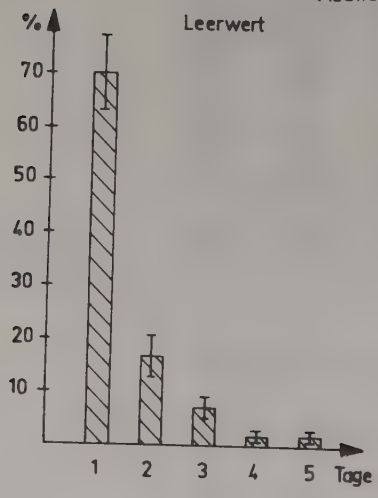


Abb.16

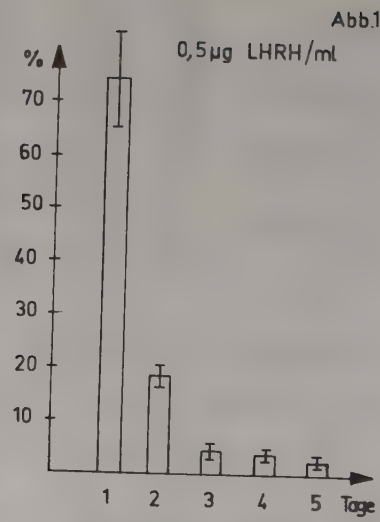


Abb.17

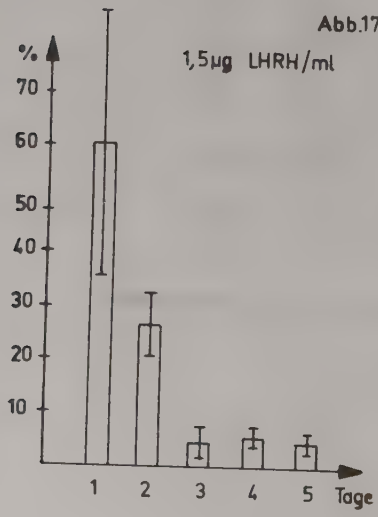
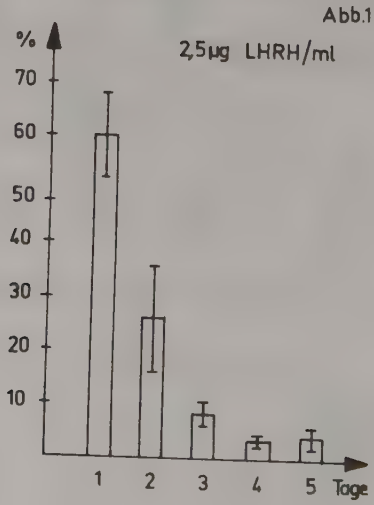


Abb.18



Versuch 3 Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert=100%)

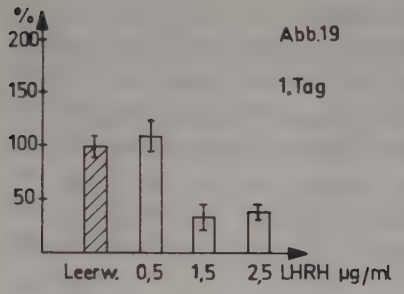


Abb.19

1.Tag

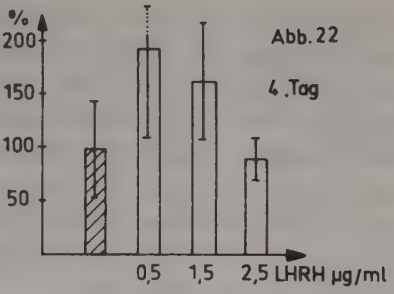


Abb. 22

4.Tag

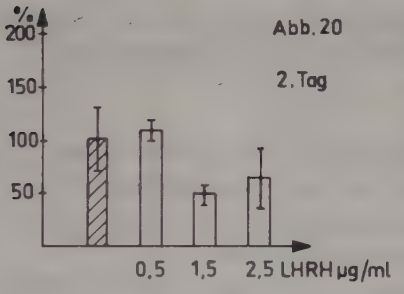


Abb. 20

2. Tag

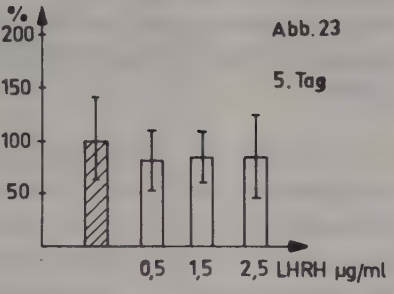


Abb. 23

5. Tag

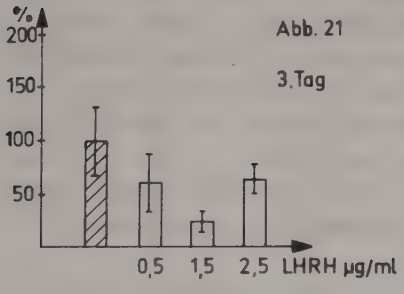


Abb. 21

3.Tag

Prozentuale LH-Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert=100%)

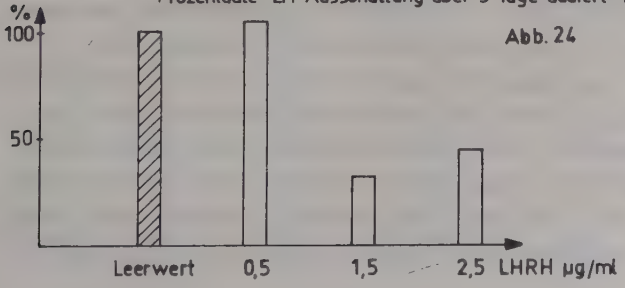


Abb. 24

Versuch 4

Durch Versuch 2 und 3 ließ sich feststellen, daß die tägliche Zugabe von LHRH (Versuch 2) im Gegensatz zu der täglichen Verdünnung von LHRH (Versuch 3) eine auch über den zweiten Versuchstag hinausgehende deutliche Steigerung der LH Ausschüttung gegenüber der Kontrollgruppe bewirkt. In Versuch 4 sollte nun geprüft werden, ob bei täglicher Zugabe von LHRH über 20 Tage auch noch nach dem fünften Tag eine wesentliche LH Freisetzung gegenüber der Leerwertsgruppe zu beobachten ist.
Der Versuchszeitraum beträgt demnach 20 Tage, die verwandten Konzentrationen entsprechen denen der vorhergehenden Versuche.

Es erscheint nun zweckmäßig die ersten fünf Versuchstage gesondert zu betrachten und sie mit den vorhergehenden Versuchen zu vergleichen. Die Versuchstage 6 - 20 stellen einen gesondert zu betrachtenden Zeitraum dar.
Bei Betrachtung der Versuchstage 1 - 5 findet man die höchste Gesamtausschüttung bei der Konzentration 0,5 µg/ml LHRH, wohingegen die Gesamtausschüttung bei der Versuchsgruppe mit 1,5 µg/ml LHRH im Bereich der Kontrollgruppe lag. Schon deutlich unter dem Wert der Kontrollgruppe lag die Ausschüttung bei der Konzentration 2,5 µg/ml LHRH.
Insgesamt ist dieses Verhalten also identisch mit den Ergebnissen von Versuch 2, was auch hinsichtlich der Versuchsanordnung der Fall ist.
Nicht so deutlich wie in Versuch 2 tritt in Versuch 4 die tägliche Steigerung der LH Ausschüttung gegenüber dem Leerwert über den zweiten Versuchstag hinaus zutage. Hier findet man bei allen Konzentrationen ein tägliches Ausschüttungsverhalten, das in etwa dem der Kontrollgruppe entspricht. Dies kann jedoch mit der initial hohen Ausschüttung in den ersten beiden Versuchstagen zu verstehen sein, was in Versuch 2 nicht der Fall war. Man stellt nur am vierten Versuchstag bei der Konzentration 1,5 µg/ml LHRH und bei 2,5 µg/ml

LHRH eine Ausschüttungssteigerung gegenüber der Kontrollgruppe fest.
Die täglichen Ausschüttungswerte der einzelnen Konzentrationsstufen vom 6. - 20. Versuchstag liegen alle im selben Bereich und auch schon deutlich unter der Ausschüttung des fünften Versuchstages. Somit zeigt sich, daß nach dem fünften Versuchstag keine wesentliche LH Freisetzung mehr stattfindet.
Zum Überblick sind nachfolgend die $\bar{x}$- und s-Werte der drei LHRH Konzentrationen für die Tage 6 - 20 aufgeführt.

Tabelle 5

Tage		0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml
6.Tag	$\bar{x}$	45	34	38
	s	±11	±15	±12
7.Tag	$\bar{x}$	25	23	24
	s	±12	± 8	± 7
8.Tag	$\bar{x}$	30	18	35
	s	± 4	± 7	±13
9.Tag	$\bar{x}$	18	24	22
	s	± 6	± 7	± 6
10.Tag	$\bar{x}$	11	17	20
	s	± 5	± 6	± 8
11.Tag	$\bar{x}$	10	9	16
	s	± 5	± 4	± 6
12.Tag	$\bar{x}$	7	8	12
	s	± 1	± 3	± 5
13.Tag	$\bar{x}$	4	3	6
	s	± 2	± 1	± 3
14.Tag	$\bar{x}$	10	25	5
	s	± 1	± 7	± 3
15.Tag	$\bar{x}$	3	1	13
	s	± 2	± 1	± 7
16.Tag	$\bar{x}$	28	35	17
	s	±13	±15	±11
17.Tag	$\bar{x}$	27	57	25
	s	±15	± 6	± 3
18.Tag	$\bar{x}$	11	25	34
	s	± 8	± 0	±15
19.Tag	$\bar{x}$	23	26	25
	s	± 4	±14	± 0
20.Tag	$\bar{x}$	54	20	25
	s	±35	±10	±12

Versuch 4 Tabelle 6

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2321	524	313	18	100
	2139	582	176	43	97
	2534	662	240	40	66
	2013	271	205	75	42
	2113	510	181	44	31
$\bar{x}$	2224	510	203	44	67
s	± 206	±146	± 66	±20	± 31
	Gesamtsumme = 3048 = 100%				
$\bar{x}$ in %	72,96	16,73	6,66	1,44	2,2
s in %	6,75	4,73	2,16	/,65	1,0

0,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2805	670	302	27	71
	4694	1060	295	30	23
	715	154	113	58	35
	2856	650	188	45	69
	853	364	200	38	54
$\bar{x}$	2385	580	220	40	50
s	±1648	± 343	± 79	±21	±12
	Gesamtsumme = 3275 = 100%				
$\bar{x}$ in %	72,8	17,7	6,7	1,22	1,5
s in %	50,3	10,4	2,4	0,64	0,3

Versuch 4 Tabelle 6

1,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2842	370	193	114	17
	2324	400	302	128	30
	1545	264	250	34	14
	1160	294	183	78	28
	3530	490	241	136	58
$\bar{x}$	2880	364	234	98	29
s	± 959	± 90	± 48	± 42	±17
	Gesamtsumme = 3005 = 100%				
$\bar{x}$ in %	75,87	12,11	7,78	3,26	1,0
s in %	31,91	2,99	1,59	1,39	0,5

2,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	2113	253	259	68	59
	2361	235	259	65	89
	1206	260	181	36	39
	1455	296	257	63	19
	1826	155	177	67	21
$\bar{x}$	1846	240	207	60	45
s	± 559	± 52	± 49	±13	±29
	Gesamtsumme = 2398 = 100%				
$\bar{x}$ in %	76,98	10,0	8,63	2,5	1,87
s in %	23,31	2,16	2,0	0,5	1,2

Versuch 4 Tabelle 6

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	9,3	28,6	32,5	45,5	46,3
0,5 µg LHRH	102,5	113,7	108,4	90,9	74,6
s in %	74,1	67,2	38,9	47,7	17,9
1,5 µg LHRH	107,2	71,4	115,3	222,7	43,3
s in %	43,1	17,6	23,6	95,4	25,3
2,5 µg LHRH	83	47	101,4	136,4	67,2
s in %	25,1	10,1	24,1	29,5	43,2

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH	1,5 µg LHRH	2,5 µg LHRH
100	107,4	98,5	78,5

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,5 µg/ml	1,5 µg/ml	2,5 µg/ml
1.Tag	-	-	-
2.Tag	-	+	++
3.Tag	-	-	-
4.Tag	-	++	+
5.Tag	+	++	+

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	0,5/1,5 µg	0,5/2,5 µg	1,5/2,5 µg
1.Tag	-	-	-
2.Tag	+	+	-
3.Tag	-	-	-
4.Tag	+	+	++
5.Tag	-	-	+

Versuch 4 Prozentuale LH-Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert=100%)

Abb.25

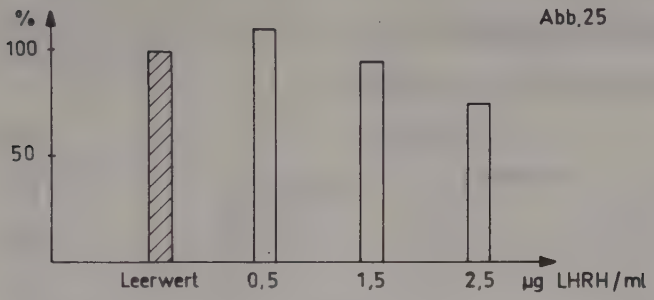


Abb.26

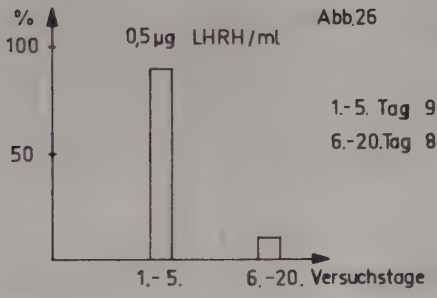


Abb.27

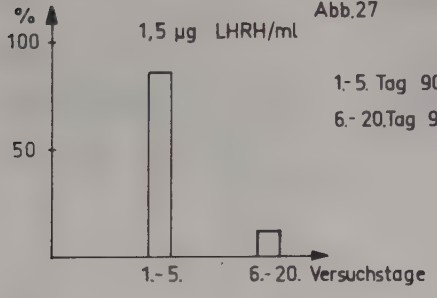
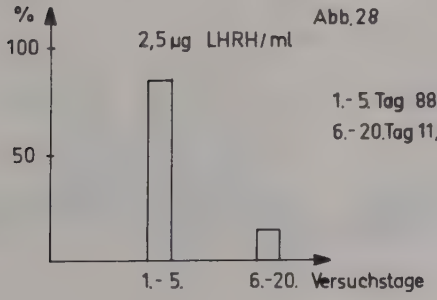


Abb.28



Versuch 4

Prozentuale LH-Ausschüttung

(Gesamtausschüttung über 5 Tage = 100 %)

Abb. 29

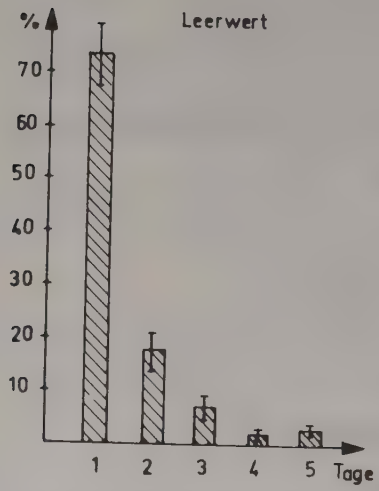


Abb. 30

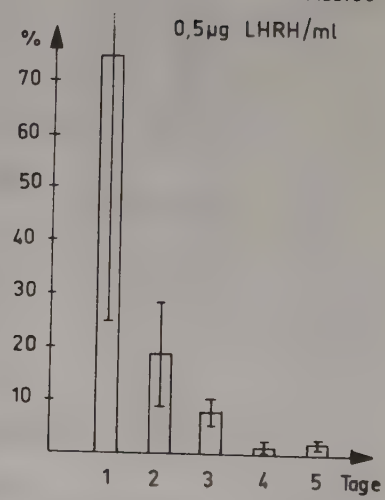


Abb. 31

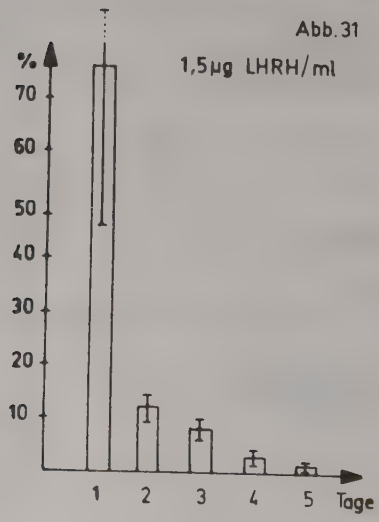
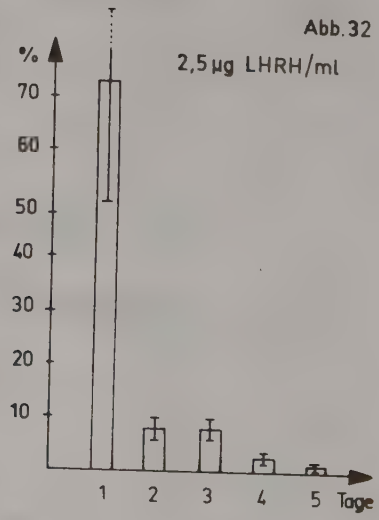
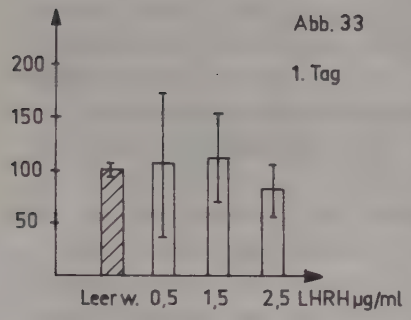


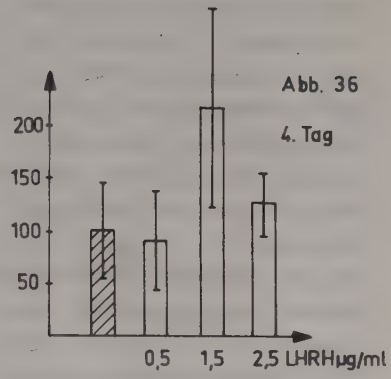
Abb. 32

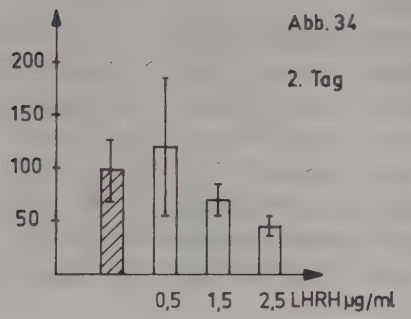


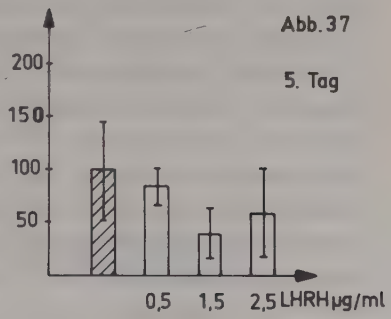
Versuch 4

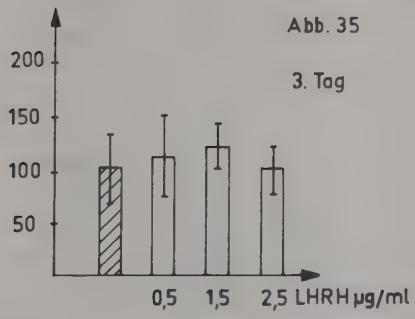
Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert = 100 %)











Die Abbildungen 38 - 40 stellen einen Vergleich der Gesamtausschüttung der Versuche 1 - 4 für die einzelnen Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1,5 µg/ml und 2,5 µg/ml LHRH) dar. Die höchsten prozentualen Ausschüttungen im Vergleich zur Kontrolle hat der Versuch 1, bei dem kein Medienwechsel stattfand. Es ergaben sich 196% bei 0,5 µg/ml LHRH, 210% bei 1,5 µg/ml und 129% bei 2,5 µg/ml LHRH. Diese höheren Ausschüttungswerte im Vergleich zu den mit Medienwechsel durchgeführten Versuchen 2 - 4 sind mit den unterschiedlichen Absolutwerten der Kontrollgruppe zu erklären.
Der Leerwert der Versuche 2 - 4 liegt weit über dem des Versuches 1.
Die Prozentwerte der Versuche 2 und 4 liegen bei den einzelnen Konzentrationen etwa in demselben Bereich. Dies beweist die Steigerung des LH Release bei täglicher Zufuhr von LHRH. Der größte Release wird bei der Konzentrationsstufe 0,5 µg/ml LHRH erreicht.
Tägliche Verdünnung des Releasinghormons wie es in Versuch 3 erfolgte, ergab was die Dosen 1,5 µg/ml und 2,5 µg/ml LHRH anbetraf, keine nennenswerte LH Ausschüttung. Lediglich die Versuchsgruppe mit 0,5 µg/ml LHRH lag mit 104% Ausschüttung geringfügig über dem Leerwert.
Insgesamt wurden die höchsten Ausschüttungen von der niedrigsten Konzentration 0,5 µg/ml LHRH erreicht. Die Werte lagen bei 3968 ng/ml bei Versuch 2, 3275 ng/ml in Versuch 4 und 3111 ng/ml in Versuch 3.

Ausschüttung LH in % bezogen auf den jeweiligen Leerwert

Abb. 38

LHRH 0,5 µg/ml

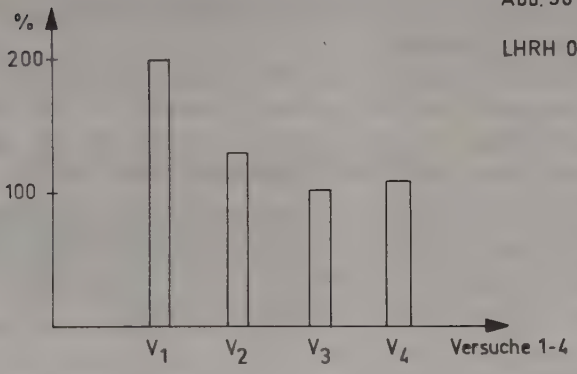


Abb. 39

LHRH 1,5 µg/ml

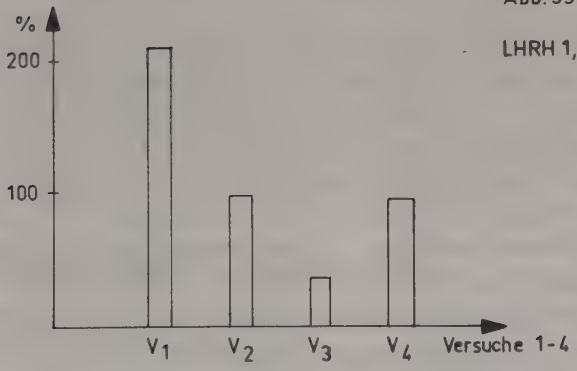
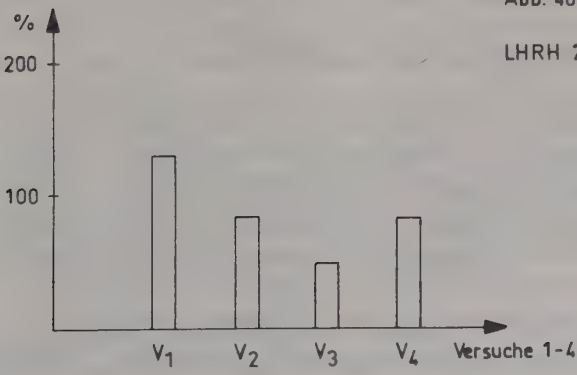


Abb. 40

LHRH 2,5 µg/ml



Versuch 5

Der Versuch diente zur kinetischen Darstellung der LH Ausschüttung über 36 Stunden.
Entsprechend den früheren Versuchen wurden Gruppen gebildet, so daß ein Leerwert und drei weitere Gruppen mit den Dosierungen 0,5 µg/ml LHRH, 1,5 µg/ml und 2,5 µg/ml LHRH vorlagen. In der ersten Stunde nach Versuchsansatz wurde viertelstündlich je 0,5 ml Medium abgezogen und frisch zugesetzt. Es erfolgte keine erneute Zugabe von LHRH. Später wurden die Wechsel halbstündlich, stündlich, dann in Abständen von zwei, drei, vier und sechs Stunden durchgeführt.

Leerwertskurve:

Der größte LH Release wird in den ersten vier Stunden erreicht. Er beträgt 65% bezogen auf die Gesamtausschüttungsmenge von 100%. Von diesen 65% werden 35,9% in der ersten Stunde ausgeschüttet. Der höchste Peak der LH Ausschüttung erfolgt nach einer halben Stunde mit einem Mittelwert von 594 ng/ml, ein zweiter Anstieg bis zu 463 ng/ml wird nach eineinhalb Stunden erreicht. In der zweiten und dritten Stunde werden 13 und 11% ausgeschüttet. In der vierten Versuchsstunde sind es noch 5%. Von der 8. - 18. Stunde beträgt die LH Ausschüttung pro Zeiteinheit von vier Stunden 5%, danach sind es 3%.

Dosis/Wirkungskurve mit 0,5 µg/ml LHRH:

Der LH Release in den ersten vier Stunden beläuft sich auf 42% bezogen auf die Gesamtausschüttung, davon 18,85% in der ersten Stunde. Der erste Peak erfolgt bereits nach einer Viertelstunde mit einer LH Ausschüttung von 491 ng/ml, danach ergibt sich nach vier Stunden ein signifikanter Anstieg zu einem Wert von 507 ng/ml, wie Tabelle 8 zu entnehmen ist. Der Zusatz von 0,5 µg/ml LHRH führt bis zum Versuchsende zu pro Zeiteinheit prozentual höheren

Ausschüttungsmengen als in der Kontrollgruppe. Die genauen Werte sind aus dem Vergleich der Abbildungen 41 und 42 ersichtlich. Als Beispiel werden ab der 18. Stunde bis zum Versuchsende zwischen 4 - 6,5% pro vier Stunden ausgeschüttet (Leerwert 3%).

Dosis/Wirkungskurve mit 1,5 µg/ml LHRH:

Die Ausschüttungsmenge beträgt 46% in den ersten vier Stunden, davon 14,6% in der ersten, 12,6% in der zweiten und dritten Stunde, 6,6% in der vierten Stunde. Der erste Peak wird mit einem Mittelwert von 615 ng/ml nach einer Viertelstunde erreicht, dann ergibt sich ein steiler Anstieg bis zu 879 ng/ml nach zwei Stunden. Dieser Wert verhält sich zum Leerwert hoch signifikant. Der absolut höchste und ebenfalls hoch signifikante Einzelwert wird mit 953 ng/ml nach drei Stunden erreicht. Von der 4. - 8. Versuchsstunde schüttet diese Gruppe 18%, von der 8. - 12. Stunde 11% aus. Nach der 18. Stunde schwanken die Ausschüttungsmengen zwischen 3 und 4,6% pro vier Stunden.

Dosis/Wirkungskurve mit 2,5 µg/ml LHRH:

Die Ausschüttungsmenge beträgt 47% in den ersten vier Stunden, davon 20,6% in der ersten, 11,4% und 10,5% in der zweiten und dritten Stunde, 4,4% in der vierten Versuchsstunde. Der erste und zugleich höchste signifikante Einzelwert ergibt sich nach einer Stunde mit 693 ng/ml. Nach zwei Stunden erfolgt eine weitere hohe LH Ausschüttung mit 685 ng/ml. Dieser Wert verhält sich ebenfalls hoch signifikant zur Kontrolle. Von der 4. - 18. Stunde werden Ausschüttungsmengen von 13, 11 und 10,6% erreicht (berechnet auf eine Zeiteinheit von jeweils vier Stunden). Gegen Versuchsende wird noch zwischen 3,8 und 5,7% ausgeschüttet.

Insgesamt gesehen zeigen die Abbildungen 41 - 44, daß bei prozentualer Aufteilung der LH Ausschüttung pro Zeiteinheit

der höchste Release in den ersten vier Stunden erfolgt. Bei den Versuchsgruppen mit Zusatz von LHRH liegt der Release zwischen 42 und 47% bei ansteigender Dosis von 0,5 - 2,5 µg/ml LHRH. Die Kontrollgruppe schüttet in derselben Zeit 65% aus. Je niedriger die zugefügte Dosis an LHRH, desto länger ist bis zum Versuchsende eine signifikante LH Ausschüttung zu beobachten.
Bezüglich der Gesamtausschüttungsmenge über 36 Stunden besteht eine dosisabhängige Steigerung der LH Ausschüttung. Diese beträgt bei der Kontrollgruppe insgesamt 5721 ng/ml, bei der Dosis 0,5 µg/ml LHRH 8401 ng/ml. Der LH Release steigert sich bis zu 13420 ng/ml bei der Versuchsgruppe mit 1,5 µg/ml LHRH. Im Konzentrationsbereich von 2,5 µg/ml LHRH ist wieder eine Abnahme der Ausschüttungsmenge auf 10829 ng/ml festzustellen. Diese Tendenz, nämlich der Rückgang des LH Release bei hohen Dosen, wurde bereits in den vorangegangenen Versuchen deutlich.

Versuch 5 Tabelle 7

Leerwert	1/4Std.	1/2Std.	3/4Std.	1 Std.	11/2Std.
ng/ml	558	436	430	398	426
	491	669	758	370	624
	493	510	308	332	334
	660	762	619	440	468
$\bar{x}$	551	594	529	385	463
s	± 79	±148	±190	± 46	±121
%	9,6	10,38	9,24	6,7	8
(Gesamtsumme = 100%)					
	2 Std.	21/2Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.
	250	296	245	288	314
	240	346	320	369	522
	248	246	244	177	285
	410	452	391	345	128
$\bar{x}$	287	335	300	295	312
s	± 82	± 88	± 70	± 86	±162
%	5	5,8	5,24	5	5,45
	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.	15 Std.
	149	136	132	162	163
	200	149	114	167	134
	169	136	160	160	150
	255	161	141	165	137
$\bar{x}$	193	146	137	164	146
s	± 46	± 12	± 19	± 3	± 13
%	3,37	2,55	2,39	2,86	2,55
	18 Std.	22 Std.	26 Std.	30 Std.	36 Std.
	139	182	186	190	224
	148	115	144	280	162
	196	187	176	137	218
	145	142	141	186	234
$\bar{x}$	157	157	162	198	210
s	± 26	± 34	± 23	± 60	± 32
%	2,74	2,74	2,83	3m46	3,67

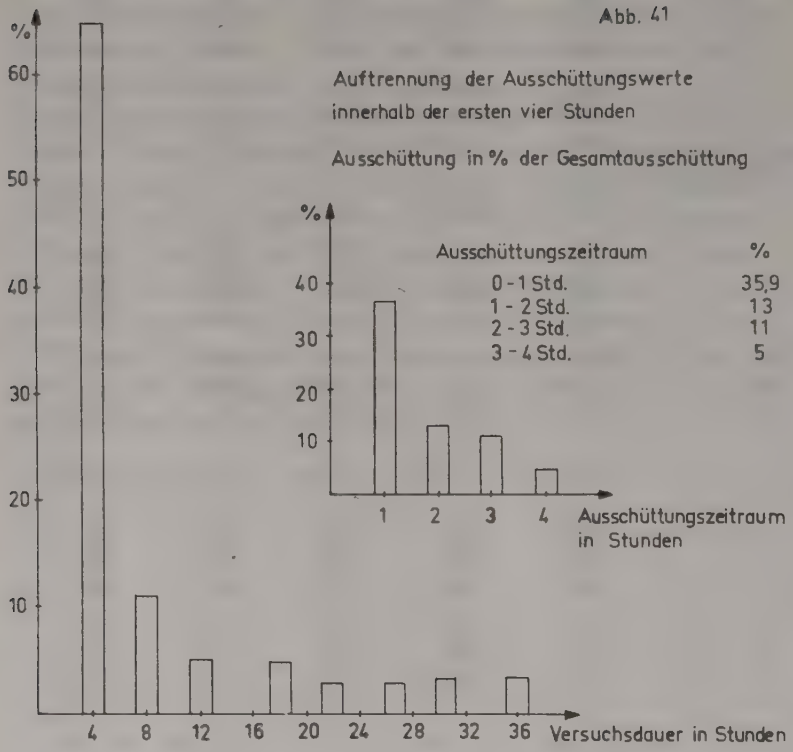
Gesamtsumme über 36 Std. = 5721 = 100%

Versuch 5

Leerwert

Ausschüttung in % der Gesamtausschüttung

Abb. 41



Ausschüttungszeitraum in Stunden	Menge in ng/ml	% in Bezug zur Gesamtausschüttung
0 - 4	3739	65
4 - 8	651	11
8 - 12	301	5
12 - 18	303	5
18 - 22	157	3
22 - 26	162	3
26 - 30	198	3,4
30 - 36	210	3,6

Versuch 5 Tabelle 8

0,5 µg LHRH	1/4Std.	1/2Std.	3/4Std.	1 Std.	11/2Std.
ng/ml	587	572	501	508	452
	546	309	371	382	433
	566	380	285	421	321
	263	220	248	175	225
$\bar{x}$	491	370	351	372	358
s	±153	±159	±112	±141	±106
%	±5,84	±4,42	±4,17	±4,42	±4,26
(Gesamtsumme = 100%)					
	2 Std.	21/2Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.
	632	329	409	527	567
	303	224	421	620	431
	249	436	357	599	464
	240	255	278	281	234
$\bar{x}$	356	311	366	507	424
s	±186	± 94	± 65	±156	±139
%	±4,23	±3,7	±4,35	±6,05	±5,04
	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.	15 Std.
	494	596	670	385	263
	384	555	665	489	496
	507	404	685	487	303
	229	369	330	228	215
$\bar{x}$	404	481	588	397	319
s	±129	±111	±172	±123	±123
%	±4,82	±5,72	±6,99	±4,72	±3,79
	18 Std.	22 Std.	26 Std.	30 Std.	36 Std.
	452	483	536	300	417
	660	610	627	641	641
	413	806	458	220	581
	264	415	219	187	296
$\bar{x}$	447	578	460	337	484
s	±163	±209	±175	±208	±157
%	±5,32	±6,88	±5,47	±4,01	±5,76

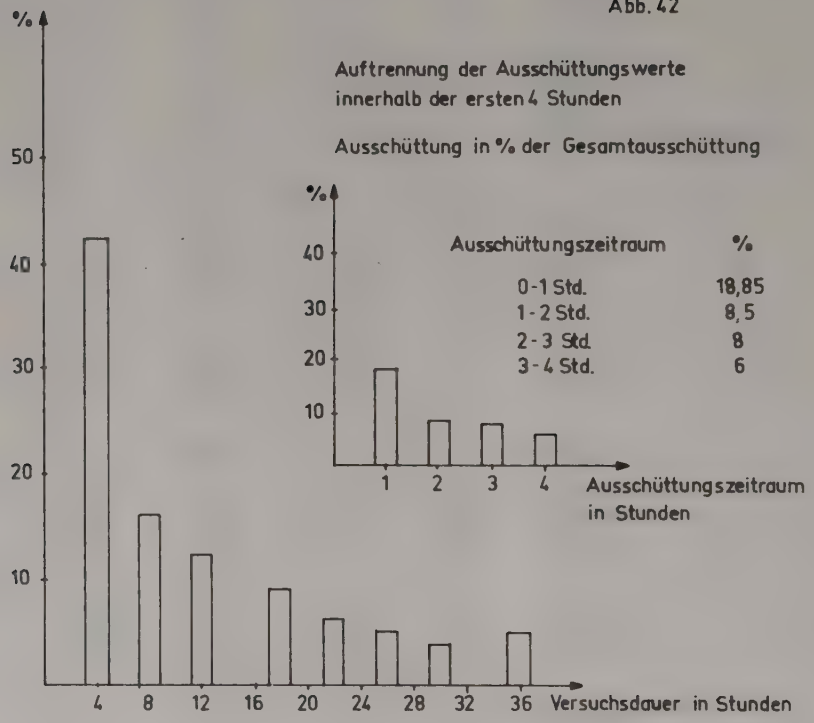
Gesamtsumme über 36 Std. = 8401 = 100%

Versuch 5

0,5 µg/ml LHRH

Ausschüttung in % der Gesamtausschüttung

Abb. 42



Ausschüttungszeitraum in Stunden	Menge in ng/ml	%in Bezug zur Gesamtausschüttung
0-4	3482	42
4-8	1309	16
8-12	985	12
12-18	766	9
18-22	548	6,5
22-26	460	5,4
26-30	337	4
30-36	484	5,7

Versuch 5 Tabelle 9

1,5 µg LHRH	1/4Std.	1/2Std.	3/4Std.	1 Std.	11/2Std.
ng/ml	937	305	643	473	945
	445	456	368	539	680
	445	382	350	324	877
	633	493	528	516	814
$\bar{x}$	615	409	472	463	814
s	±232	± 83	±139	± 97	±119
%	4,58	3,04	3,51	3,45	6,06
(Gesamtsumme = 100%)					

	2 Std.	21/2Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.
	1100	981	912	1100	1100
	1100	544	1072	903	1100
	584	630	777	600	477
	733	809	1050	945	605
$\bar{x}$	879	741	953	887	821
s	±262	±194	±137	±209	±327
%	6,54	5,52	7,1	6,6	6,11

	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.	15 Std.
	1086	998	709	884	297
	769	553	865	677	486
	535	512	464	397	373
	1256	727	1100	650	971
$\bar{x}$	912	698	785	652	532
s	±322	±221	±267	±200	±303
%	6,79	5,2	5,84	4,85	3,96

	18 Std.	22 Std.	26 Std.	30 Std.	36 Std.
	762	521	582	591	823
	578	804	585	507	671
	437	489	391	332	420
	606	703	625	272	446
$\bar{x}$	596	629	546	426	590
s	±133	±150	±105	±149	±192
%	4,44	4,68	4,06	3,17	4,39

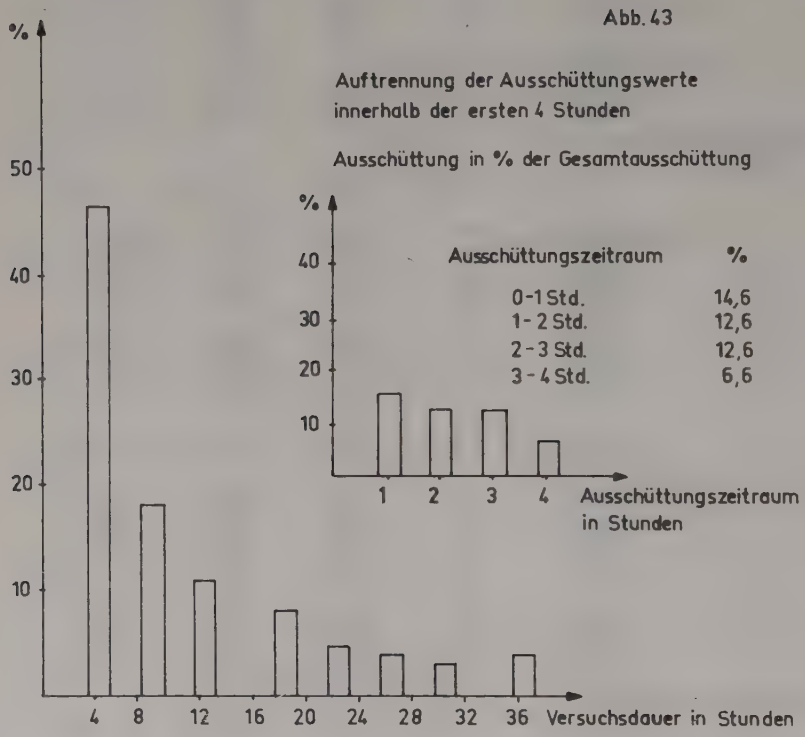
Gesamtsumme über 36 Std. = 13420 = 100%

Versuch 5

1,5µg/ml LHRH

Ausschüttung in % der Gesamtausschüttung

Abb. 43



Ausschüttungszeitraum in Stunden	Menge in ng/ml	% in Bezug zur Gesamtausschüttung
0-4	6233	46
4-8	2431	18
8-12	1437	11
12-18	1128	8
18-22	629	4,6
22-26	546	4
26-30	426	3
30-36	590	4,3

Versuch 5 Tabelle 10

2,5 µg LHRH	1/4Std.	1/2Std.	3/4Std.	1 Std.	11/2Std.
ng/ml	656	594	440	871	691
	633	417	481	415	371
	401	411	411	631	408
	689	659	385	854	742
$\bar{x}$	595	520	429	693	553
s	±131	±126	± 41	±215	±191
%	5,49	4,8	3,96	6,39	5,1
(Gesamtsumme = 100%)					
	2 Std.	21/2Std.	3 Std.	4 Std.	5 Std.
	977	557	755	643	512
	598	414	478	556	449
	476	478	429	211	424
	689	738	682	494	510
$\bar{x}$	685	547	586	476	474
s	±213	±140	±157	±187	± 44
%	6,32	5,05	5,41	4,39	4,37
	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.	15 Std.
	432	636	666	689	770
	353	394	489	563	544
	373	484	766	477	340
	542	606	629	639	534
$\bar{x}$	425	530	638	592	547
s	± 85	±112	±115	± 93	±176
%	3,92	4,89	5,89	5,46	5,53
	18 Std.	22 Std.	26 Std.	30 Std.	36 Std.
	577	815	604	538	495
	406	557	215	380	556
	589	490	434	256	648
	822	608	390	486	285
$\bar{x}$	599	618	411	415	496
s	±171	±140	±160	±125	±154
%	5,53	5,7	3,79	3,83	4,58

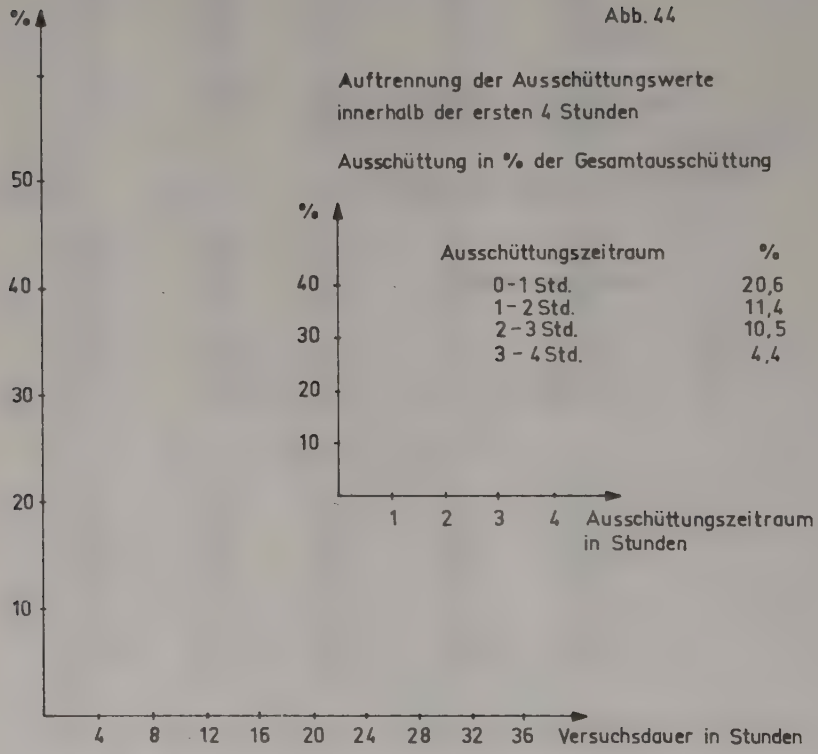
Gesamtsumme über 36 Std. = 10829 = 100%

Versuch 5

2,5 µg/ml LHRH

Ausschüttung in % der Gesamtausschüttung

Abb. 44



Auftrennung der Ausschüttungswerte innerhalb der ersten 4 Stunden

Ausschüttung in % der Gesamtausschüttung

Ausschüttungszeitraum	%
0-1 Std.	20,6
1-2 Std.	11,4
2-3 Std.	10,5
3-4 Std.	4,4

Ausschüttungszeitraum in Stunden	Menge in ng/ml	% in Bezug zur Gesamtausschüttung
0-4	5084	47
4-8	1429	13
8-12	1230	11
12-18	1146	10,6
18-22	618	5,7
22-26	411	3,8
26-30	415	3,8
30-36	496	4,5

Versuch 5 Tabelle 11

Statistische Auswertung

	Signifikanz gegen Kontrolle			Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen		
	0,5µg/ml	1,5µg/ml	2,5µg/ml	0,5/1,5µg	0,5/2,5µg	1,5/2,5µg
1/4 Std.	-	-	-	-	-	-
1/2 Std.	+	+	+	-	-	-
3/4 Std.	-	-	-	-	-	-
1 Std.	-	-	+	-	+	+
11/2Std.	-	++	-	++	+	+
2 Std.	-	++	++	++	+	-
21/2Std.	-	++	+	++	+	-
3 Std.	-	++	++	++	+	++
4 Std.	+	++	+	+	-	+
5 Std.	-	+	+	+	-	+
6 Std.	++	++	++	+	-	+
8 Std.	++	++	++	-	-	-
10 Std.	++	++	++	+	-	-
12 Std.	++	++	++	+	+	-
15 Std.	+	+	++	-	+	-
18 Std.	++	++	++	-	-	-
22 Std.	++	++	++	-	-	-
26 Std.	++	++	++	-	-	-
30 Std.	-	+	++	-	-	-
36 Std.	++	++	++	-	-	-

Versuch 6

Dieser Versuch sollte dazu dienen, das Ausschüttungsverhalten der Hypophysen bei gemeinsmaer Zugabe von LHRH und Acetylsalicylsäure zu untersuchen. Es wurde eine Kontrollgruppe und drei Versuchsgruppen mit steigender Dosierung von ACS (0,1 mg, 0,5 mg und 1 mg) gebildet. Den Versuchsgruppen wurde jeweils noch 0,5 µg LHRH/ml, diese Konzentration ergab in den bisherigen Versuchen die höchste LH Freisetzung, zugesetzt. Der Medienwechsel erfolgte entsprechend Versuch 3, d.h. täglicher Abzug des Mediums bis auf 1 ml und Zugabe von frischem Medium bis zum ursprünglichen Volumen ohne erneute Zufuhr von ACS und LHRH. Der Versuch wurde nach fünf Tagen abgebrochen. Von der Versuchsanordnung sind Versuch 3 und Versuch 6 vergleichbar.

Die Gesamtausschüttung der Leerwertsgruppe beträgt 1577 ng/ml. Dieser Wert liegt deutlich unter dem von Versuch 3 (3048 ng/ml). Die Versuche bei Zugabe von LHRH und ACS zeigen folgende Tendenz. Die höchste Gesamtausschüttung mit 2032 ng/ml findet sich bei Zusatz von 0,5 µg LHRH und 0,1 mg ACS. Bei Steigerung der Dosierung von ACS ergibt sich eine Abnahme der Gesamtausschüttung (bei 0,5 µg LHRH + 0,5 mg ACS 1937 ng/ml, 0,5 µg LHRH + 1 mg ACS 1933 ng/ml). Betrachtet man die prozentual zur Gesamtsumme berechnete tägliche Ausschüttung innerhalb der Versuchsgruppen, so findet man in vorliegendem Versuch ein zu Versuch 3 abweichendes Verhalten. Bis zum vierten Versuchstag tritt eine relevante LH Freisetzung auf. So ergibt sich beispielsweise bei der Kontrollgruppe am dritten Tag ein LH Release von 15%, am vierten Tag 8%. Dagegen werden in Versuch 3 6,6% am dritten und 1,5% am vierten Versuchstag ausgeschüttet.
Dieses Verhalten findet man in allen vier Gruppen von Versuch 6.

Versuch 6 Tabelle 12

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	1067	919	257	220	123
	921	348	210	135	92
	477	245	214	135	52
	373	310	258	67	69
	514	501	124	85	56
$\bar{x}$	670	465	235	129	78
s	± 304	±271	± 23	± 59	± 29
	Gesamtsumme = 1577 = 100%				
$\bar{x}$ in %	42,49	29,49	14,9	8,18	4,94
s in %	19,27	17,1	1,4	3,7	1,8

0,5 µg LHRH + 0,1 mg ACS	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	502	627	460	246	105
	643	430	337	190	103
	1079	514	223	95	85
	1322	593	342	211	88
	888	527	431	126	81
$\bar{x}$	887	538	341	174	92
s	± 301	± 76	± 83	± 62	± 11
	Gesamtsumme = 2032 = 100%				
$\bar{x}$ in %	43,65	26,47	16,79	8,59	4,52
s in %	14,8	3,74	4,08	3,05	0,54

Versuch 6 Tabelle 12

0,5 µg LHRH + 0,5 mg ACS	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	550	558	362	191	94
	1122	315	409	370	187
	749	492	289	229	164
	912	237	172	211	87
	887	512	321	161	101
$\bar{x}$	844	423	311	232	127
s	± 212	±139	± 90	± 81	± 46
	Gesamtsumme = 1937 = 100%				
$\bar{x}$ in %	43,54	21,83	16,05	11,97	6,55
s in %	1,9	7,17	4,6	4,18	2,37

0,5 µg LHRH + 1 mg ACS	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	516	294	226	107	130
	1428	599	434	205	92
	869	377	382	249	81
	774	635	363	192	83
	869	415	169	102	76
$\bar{x}$	891	464	315	171	92
s	± 333	±147	±112	± 65	± 22
	Gesmatsumme = 1933 = 100%				
$\bar{x}$ in %	46,09	24,0	16,29	8,84	4,75
s in %	17,2	7,6	5,8	3,36	1,13

Versuch 6 Tabelle 12

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	45,3	58,2	9,7	45,7	37,1
0,5 µg LHRH + 0,1 mg ACS	132,4	115,7	145,1	134,9	117,9
s in %	44,9	16,5	35,3	48	14,1
0,5 µg LHRH + 0,5 mg ACS	126	91	132,3	179,8	162,8
s in %	31,6	29,8	38,2	62,7	58,9
0,5 µg LHRH + 1 mg ACS	133	99,8	134,9	132,6	117,9
s in %	49,7	31,6	47,6	50,3	28,2

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH + 0,1 mg ACS	0,5 µg LHRH + 0,5 mg ACS	0,5 µg LHRH + 1 mg ACS
100	128,9	122,8	122,6

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,1 mg ACS	0,5 mg ACS	1 mg ACS
1.Tag	-	-	-
2.Tag	-	-	-
3.Tag	+	+	-
4.Tag	-	+	-
5.Tag	-	+	-

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	0,1/0,5 mg	0,1/1 mg	0,5/1 mg
1.Tag	-	-	-
2.Tag	+	-	-
3.Tag	-	-	-
4.Tag	-	-	-
5.Tag	+	-	-

Versuch 6

Prozentuale LH-Ausschüttung
(Gesamtausschüttung über 5 Tage = 100 %)

Abb. 45

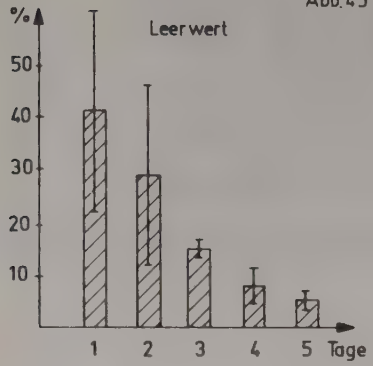


Abb. 46

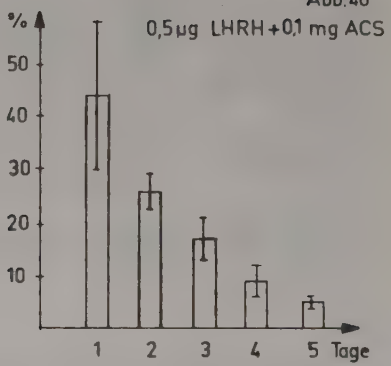


Abb. 47

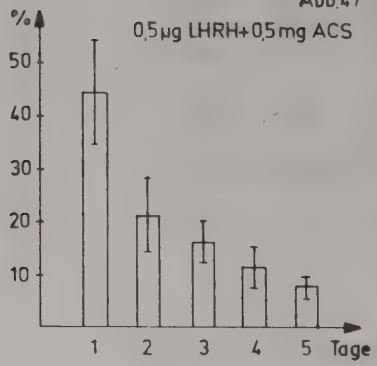
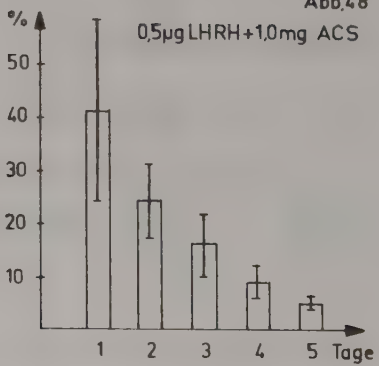
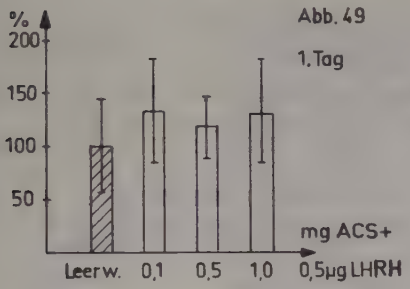
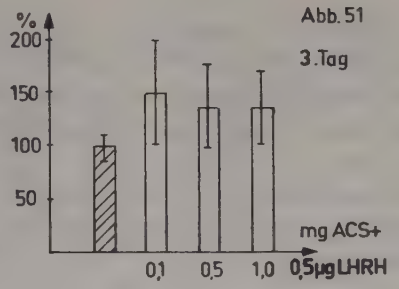


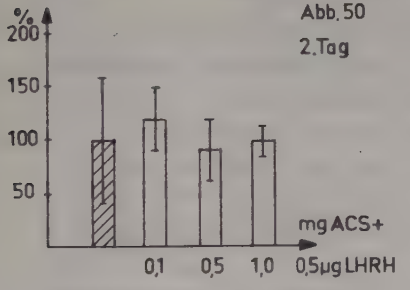
Abb. 48

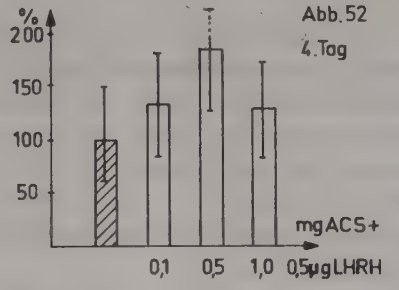


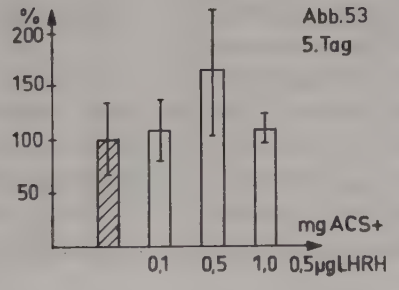
Versuch 6 Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert=100%)



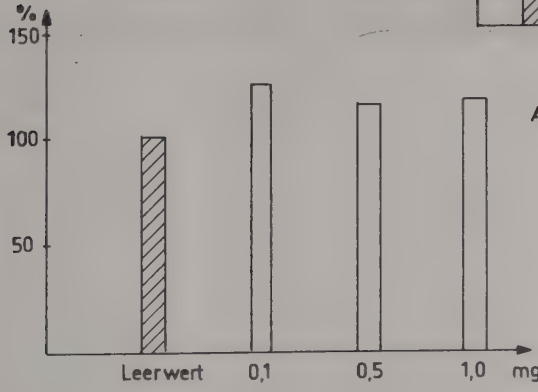








Prozentuale LH-Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert=100%)



Versuch 7

In Versuch 7 wurde die LH Freisetzung bei gemeinsamer Zugabe von LHRH und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ geprüft.
Die Versuchsgruppen enthielten jeweils 0,5 µg LHRH und in steigender Dosierung Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 0,01 mg, 0,1 mg und 0,5 mg.
Es fand täglicher Medienwechsel ohne erneuten Zusatz von LHRH bzw. PG $F_{2\alpha}$ statt. Der Versuchsabbruch erfolgte nach fünf Tagen.

Bei Betrachtung der Gesamtausschüttung über fünf Tage findet man eine Prostaglandin $F_{2\alpha}$-dosisabhängige Steigerung des LH Release, dieser ist besonders deutlich bei der Konzentration PG $F_{2\alpha}$ von 0,5 mg. Die höchste Gesamtsumme ergibt sich bei Zugabe von PG $F_{2\alpha}$ 0,5 mg + LHRH 0,5 µg.
Bei Zusatz von 0,1 mg und 0,01 mg PG $F_{2\alpha}$ ist die LH Ausschüttung wesentlich geringer als bei Zufuhr von 0,5 mg Prostaglandin $F_{2\alpha}$.
In jeder einzelnen Versuchsgruppe wird mehr LH freigesetzt als beim Leerwert.
Bei Betrachtung der prozentualen Ausschüttung bezogen auf den Leerwert und für jeden einzelnen Versuchstag betrachtet, stellt man eine tägliche Ausschüttungssteigerung fest, die bis zum fünften Versuchstag reicht. Diese Steigerung ist abhängig von der PG $F_{2\alpha}$ Konzentration, sie ist demnach am ausgeprägtesten bei Zugabe von 0,5 mg Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

Versuch 7 Tabelle 13

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	310	150	148	112	139
	692	457	216	137	132
	411	188	96	82	97
	612	331	195	126	50
$\bar{x}$	506	282	164	114	105
s	±176	±141	± 54	± 24	± 41
	Gesamtsumme = 1171 = 100%				
$\bar{x}$ in %	43,2	24	14	9,7	8,96
s in %	15	12	4,6	2	3,5

0,5 µg LHRH + 0,01 mg PG $F_{2\alpha}$	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	611	477	220	134	96
	364	539	162	161	94
	293	339	61	64	63
	492	385	182	103	100
$\bar{x}$	440	435	156	116	88
s	±141	± 90	± 68	± 42	± 17
	Gesamtsumme = 1235 = 100%				
$\bar{x}$ in %	35,6	35,2	12,6	9,4	7,1
s in %	11,4	7,3	5,5	3,4	1,4

Versuch 7 Tabelle 13

0,5 µg LHRH + 0,1 mg PG $F_{2\alpha}$	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	455	180	98	59	30
	557	279	362	322	225
	430	215	86	100	42
	368	580	270	179	125
$\bar{x}$	452	313	204	165	106
s	± 79	±183	±135	±116	± 90
	Gesamtsumme = 1204 = 100%				
$\bar{x}$ in %	37,5	26	16,9	13,7	8,8
s in %	6,5	15,2	11,2	9,6	7,4

0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	1042	527	381	205	152
	1100	386	337	143	92
	1100	443	398	199	180
	924	753	406	272	186
$\bar{x}$	1041	527	381	205	152
s	± 102	±197	± 38	± 65	± 53
	Gesamtsumme = 2306 = 100%				
$\bar{x}$ in %	45,1	22,85	16,5	8,88	6,6
s in %	4,4	8,5	1,6	2,8	2,2

Versuch 7 Tabelle 13

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	34,7	50	32,9	21	39
0,5 µg LHRH + 0,01 mg PG $F_{2\alpha}$	86,9	154,3	95,1	101,8	83,8
s in %	27,8	31,9	41,4	36,8	16,1
0,5 µg LHRH + 0,1 mg PG $F_{2\alpha}$	89,3	111	124,4	144,7	101
s in %	15,6	64,8	82,3	101	85,7
0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	205,7	186,9	232,3	179,8	144,7
s in %	20,1	69,8	23,1	57	50,4

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH + 0,01 mg PG $F_{2\alpha}$	0,5 µg LHRH + 0,1 mg PG $F_{2\alpha}$	0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$
100	105,5	102,8	196,9

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,01 mg PG $F_{2\alpha}$	0,1 mg PG $F_{2\alpha}$	0,5 mg PG $F_{2\alpha}$
1.Tag	-	-	++
2.Tag	+	-	+
3.Tag	-	-	++
4.Tag	-	-	++
5.Tag	-	-	-

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	0,01/0,1 mg	0,01/0,5 mg	0,1/0,5 mg
1.Tag	-	++	++
2.Tag	+	-	+
3.Tag	-	++	+
4.Tag	-	+	-
5.Tag	-	+	-

Versuch 7

Prozentuale LH-Ausschüttung
(Gesamtausschüttung über 5 Tage=100%)

Abb. 55

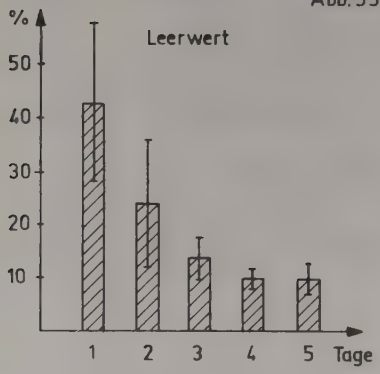


Abb. 56

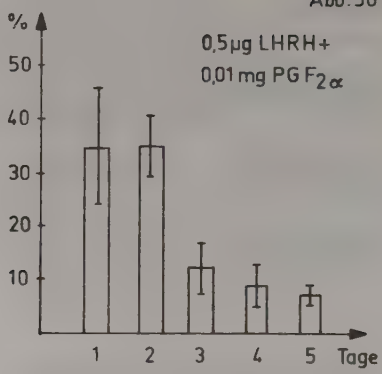


Abb. 57

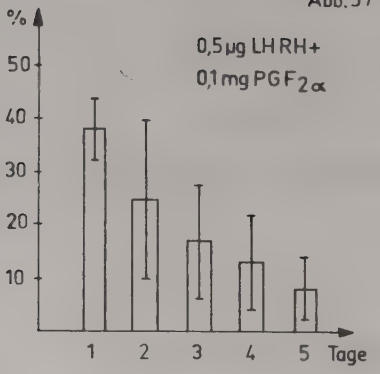
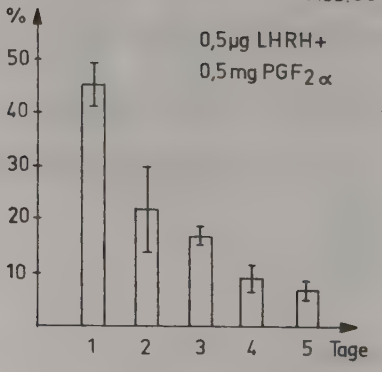


Abb. 58



Versuch 7 Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert=100%)

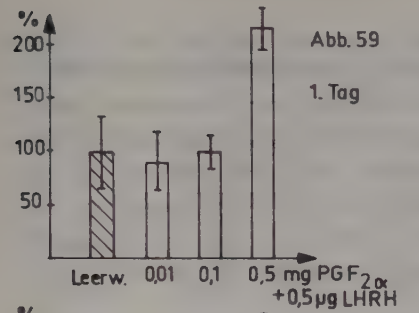


Abb. 59
1. Tag

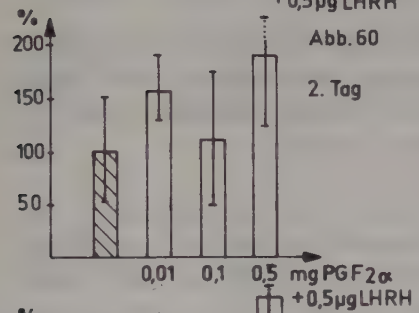


Abb. 60
2. Tag

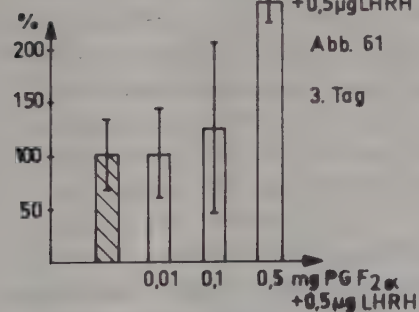


Abb. 61
3. Tag

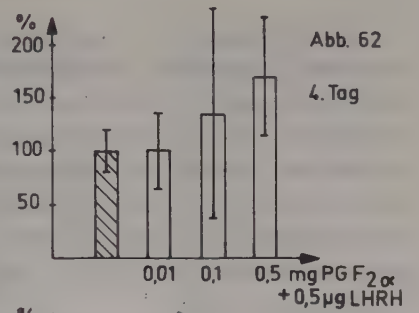


Abb. 62
4. Tag

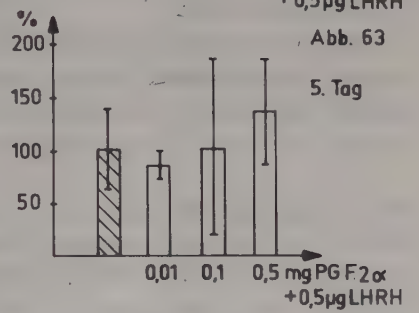


Abb. 63
5. Tag

Prozentuale LH Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert=100%)

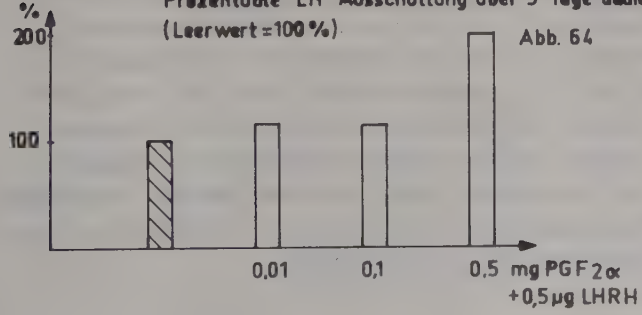


Abb. 64

Versuch 8

Im vorhergehenden Versuch konnte gezeigt werden, daß die gemeinsame Zugabe von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ in einem gewissen Konzentrationsbereich zu einer Steigerung des LH Release führt. In diesem Versuch sollte nun bei identischen Versuchsbedingungen (täglicher Medienwechsel ohne erneuten Zusatz von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ und Versuchsabbruch nach fünf Tagen) geprüft werden, wie die alleinige Zugabe von PG $F_{2\alpha}$ oder LHRH bzw. der gemeinsame Zusatz von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ auf die LH Freisetzung wirkt.
Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet. Eine Leerwertsgruppe, eine Gruppe mit der Zugabe von 0,5 µg/ml LHRH, eine Gruppe mit PG $F_{2\alpha}$ 0,5 mg und eine Gruppe mit gemeinsamer Zufuhr von LHRH 0,5 µg und PG $F_{2\alpha}$ 0,5 mg.

Die Gesamtausschüttung von LH über fünf Tage addiert ist bei allen drei Versuchsgruppen gegenüber der Kontrolle deutlich gesteigert (Leerwert 100% = 1827 ng/ml, LHRH 0,5 µg/ml 2903 ng/ml = 159%, PG $F_{2\alpha}$ 0,5 mg 3087 ng/ml = 169%, LHRH 0,5 µg/ml + PG $F_{2\alpha}$ 0,5 mg 2970 ng/ml = 163%), wobei die Unterschiede der Gesamtausschüttung innerhalb der Versuchsgruppen nicht besonders auffällig sind. Die Gruppe mit alleiniger Zugabe von PG $F_{2\alpha}$ setzt mengenmäßig am meisten LH frei. Bei Betrachtung der täglichen Ausschüttung findet man bei Zusatz von 0,5 µg/ml LHRH und bei 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ am ersten Tag eine hohe LH Freisetzung, die dann ab dem zweiten Versuchstag kontinuierlich abfällt und hinsichtlich ihrer Dynamik derjenigen des Leerwertes entspricht; die ersten beiden Versuchstage setzen signifikant mehr LH frei als die Kontrollgruppe.
Von diesem Verhalten weicht die Gruppe mit gemeinsamer Zugabe von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ wesentlich ab. Hier ist die initial hohe LH Freisetzung am ersten Versuchstag nicht vorhanden, im Gegenteil findet man die höchste tägliche LH Freigabe erst am zweiten Versuchstag. Auch nach dem zweiten Versuchstag nimmt dann die Ausschüttung ab, liegt aber an allen Versuchstagen signifikant höher als der Leerwert.

Versuch 8 Tabelle 14

Leerwert	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	727	255	145	80	46
	748	616	353	209	107
	832	473	383	117	93
	1038	601	288	139	115
	698	517	234	185	132
$\bar{x}$	809	492	281	146	99
s	± 273	±145	± 95	± 52	± 33
	Gesamtsumme = 1827 = 100%				
$\bar{x}$ in %	44,28	26,92	15,38	7,99	5,4
s in %	14,34	7,93	5,19	2,84	1,8

0,5 µg LHRH	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	1114	654	540	240	183
	1101	504	237	112	134
	1415	818	408	199	111
	2016	846	685	399	158
	1268	668	390	200	114
$\bar{x}$	1383	698	452	230	140
s	± 376	±139	±169	±105	± 31
	Gesamtsumme = 2903 = 100%				
$\bar{x}$ in %	47,64	24,04	15,57	7,92	4,82
s in %	12,95	4,78	5,82	3,61	1,06

Versuch 8 Tabelle 14

0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	1305	844	720	159	215
	805	900	156	99	41
	1714	1072	419	255	193
	2094	1063	460	328	127
	1546	541	197	99	90
$\bar{x}$	1492	884	390	188	133
s	± 480	± 216	±227	±101	± 72
	Gesamtsumme = 3087 = 100%				
$\bar{x}$ in %	48,33	28,63	12,63	6,09	4,3
s in %	15,54	6,99	7,35	3,27	2,3

0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
ng/ml	476	1201	752	343	277
	863	959	825	401	195
	549	819	375	191	135
	887	1282	683	483	179
$\bar{x}$	694	1065	659	355	197
s	±212	± 214	±198	±123	± 59
	Gesamtsumme = 2970 = 100%				
$\bar{x}$ in %	23,36	35,85	22,18	11,98	6,63
s in %	7,13	7,2	6,66	4,14	1,98

Versuch 8 Tabelle 14

% Aufteilung bei Leerwert = 100%

Tage	1.Tag	2.Tag	3.Tag	4.Tag	5.Tag
Leerwert	100	100	100	100	100
s in %	16,9	29,4	33,8	35,6	33,3
0,5 µg LHRH	170,9	141,9	160,9	157,5	141,4
s in %	46,4	28,2	60,1	96,3	31,3
0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	184,4	179,7	138,3	128,8	134,3
s in %	59,3	43,9	80,7	69,1	72,7
0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	85,8	216,5	234,5	243,2	199
s in %	26,2	43,3	70 4	84,2	59,5

% Aufteilung der Gesamtsummen

Leerwert	0,5 µg LHRH	0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$
100	158,9	169	162,6

Statistische Auswertung

Signifikanz gegen Kontrolle

	0,5 µg LHRH	0,5 mg PG $F_{2\alpha}$	0,5 µg LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$
1.Tag	+	+	+
2.Tag	+	++	++
3.Tag	+	-	++
4.Tag	-	-	++
5.Tag	+	-	++

Signifikanz innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen

	LHRH/PG $F_{2\alpha}$	LHRH/PG $F_{2\alpha}$ + LHRH	PG $F_{2\alpha}$/PG $F_{2\alpha}$ + LHRH
1.Tag	-	++	++
2.Tag	+	++	-
3.Tag	-	-	+
4.Tag	-	+	+
5.Tag	-	+	-

Versuch 8

Prozentuale LH-Ausschüttung
(Gesamtausschüttung über 5 Tage = 100%)

Abb. 65

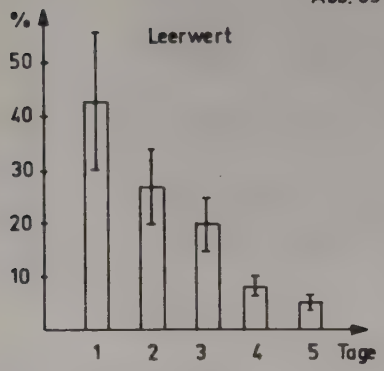


Abb. 66

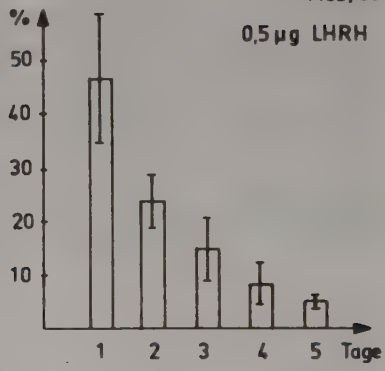


Abb. 67

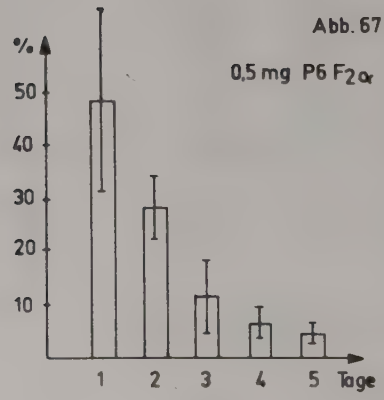
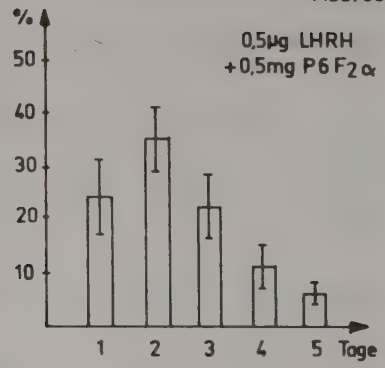


Abb. 68



Versuch 8

Prozentuale Steigerung der LH-Ausschüttung gegenüber dem Leerwert (Leerwert = 100%)

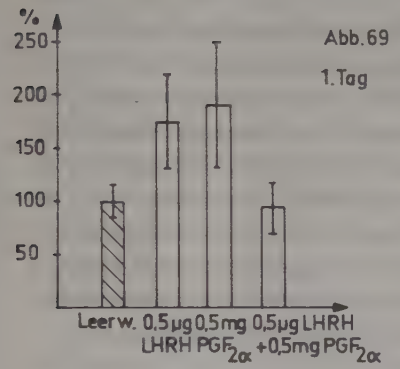


Abb. 69
1. Tag

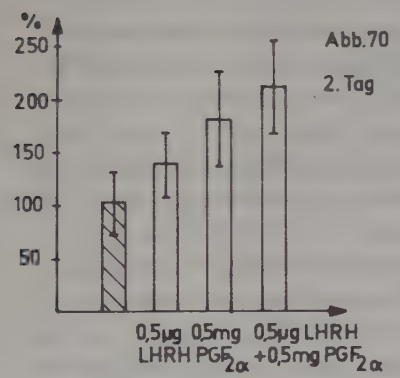


Abb. 70
2. Tag

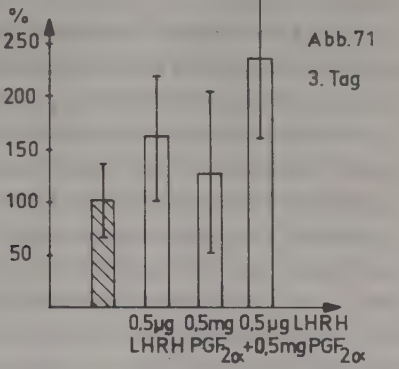


Abb. 71
3. Tag

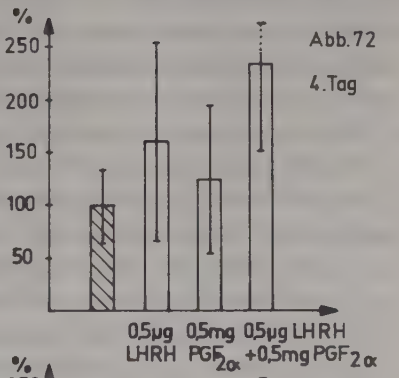


Abb. 72
4. Tag

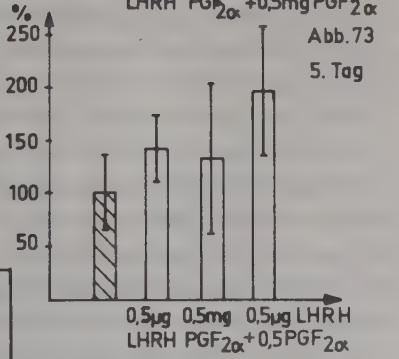


Abb. 73
5. Tag

Prozentuale LH-Ausschüttung über 5 Tage addiert (Leerwert = 100%)

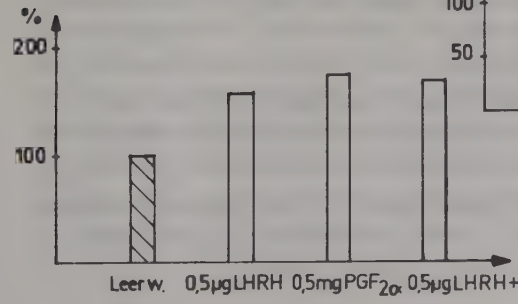


Abb. 74

5. DISKUSSION

Nachdem in früheren Versuchen mit Hypothalamusextrakten verschiedener Spezies ein Gonadotropin-Release nachgewiesen worden war (35,50,51a), konzentrierten sich die weiteren Forschungen auf die Herstellung eines synthetischen Releasinghormons. Die Arbeitsgruppe von SCHALLY sicherte durch Hydrolyse und enzymatische Aufarbeitung den Peptidcharakter der wirksamen Substanz (55c). Unter GEIGER von den Farbwerken Hoechst gelang 1971 die genaue Synthese des LHRH (14). Durch diesen Erfolg war es nun möglich Versuche über die Wirkungsweise des Releasinghormons in größerem Umfang durchzuführen.
In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen mit kultivierten Rattenhypophysen unter Zugabe des synthetischen LHRH 10-6309 (Fa. La Roche, Basel) durchgeführt.
Es stellten sich folgende Fragen:
a) Findet unter den jeweiligen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit der Konzentration an LHRH eine Förderung oder Hemmung der LH Ausschüttung statt?
b) Gibt es Hinweise auf eine Neusynthese von LH nach Zusatz von LHRH?
c) Kinetische Studie der LH Ausschüttung
d) Hat Acetylsalicylsäure + LHRH und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ allein und in Kombination mit LHRH einen Einfluß auf den LH Release?

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche zeigen, daß im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe der synthetische LHRH eine LH Ausschüttung bewirkt.
Bei seinen 1972 durchgeführten Untersuchungen stellte SCHALLY bei einmaliger LHRH Zugabe und Kultivierung der Rattenhypophysen über fünf Tage eine signifikante dosisabhängige LH Freisetzung fest (45).
In Anlehnung an seine Versuche wurde in vorliegender Arbeit in einem Konzentrationsbereich von 0,5 - 2,5 µg/ml LHRH gearbeitet.

Zunächst wurde die Gesamtausschüttung bei einer Versuchsdauer von fünf Tagen und in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Gegenüber der Kontrollgruppe ergab sich eine Stimulierung der LH Ausschüttung in einem Konzentrationsbereich von 0,5 - 1,5 µg/ml LHRH. Die freigesetzte LH Menge war bei der Konzentration 0,5 µg/ml um 96% (insgesamt 196%) und bei der Konzentration 1,5 µg/ml um 110% (insgesamt 210%) im Vergleich zum Leerwert (insgesamt 100%) erhöht. Bei der Konzentration von 2,5 µg/ml wurde deutlich weniger LH freigesetzt, so daß die Gesamtmenge nur geringfügig über der Kontrollgruppe lag.
In weiteren Versuchen sollte durch Messung der täglich freigesetzten LH Menge das tägliche Ausschüttungsverhalten der Hypophysen bei einmaliger LHRH Zugabe bzw. bei täglicher LHRH Zugabe aufgezeigt werden. Die höchste Gesamtausschüttung bei täglicher LHRH Zugabe fand sich im Konzentrationsbereich 0,5 µg/ml (3968 ng/ml, Leerwert 3048 ng/ml). Weitere Steigerung der zugesetzten LHRH Konzentration führte zu einer abnehmenden LH Freisetzung. Bei täglicher Zufuhr von 2,5 µg/ml LHRH schütten die Hypophysen deutlich weniger LH aus als in der Kontrollgruppe, es scheint hier also eine Hemmung des LH Release vorzuliegen. Es könnte sich um den schon von STEINBERGER beschriebenen cytotoxischen Effekt bei entsprechender Dosierung des LHRH handeln. STEINBERGER arbeitete mit Hypothalamusextrakten (HE) und erhielt bei 50% Zusatz von HE den höchsten Release. Bei höheren Konzentrationen stellte er eine Abnahme der Ausschüttung fest und vermutete, daß bei hoher Dosis ein cytotxischer Effekt zustande kommt. Fraglich war, ob das Releasinghormon selbst oder Verunreinigungen des HE cytotoxisch wirkten (58).
Die höchste tägliche LH Freisetzung fand man bei allen Versuchsgruppen am ersten Tag. Dies dürfte wohl eine Folge der mechanischen Zerstörung der LH-Speicher und dadurch bedingter LH Freigabe ins Inkubationsmedium sein.
Im Unterschied zur Kontrollgruppe findet sich dann bei täglicher LHRH Zugabe auch noch nach dem zweiten Versuchs-

tag eine wesentliche Ausschüttung von LH. So findet man zum Beispiel bei der Konzentration 2,5 µg/ml LHRH insgesamt eine geringere LH Freigabe als beim Kontrollwert, jedoch wird am vierten und fünften Versuchstag noch jeweils 11% der Gesamtausschüttung freigesetzt, zu diesem Zeitpunkt sind es in der Leerwertsgruppe nur noch 1 - 2%. Es scheint also, als ob täglich zugegebenes LHRH initial die Ausschüttung bremst, dann aber protrahiert LH bis zum fünften Versuchstag freigibt.
MITTLER et al. fanden im entsprechenden Konzentrationsbereich bei zweimal täglicher LHRH Zugabe über drei Tage einen signifikanten LH Release im Vergleich zur Kontrolle (36). SCHALLY, KASTIN und ARIMURA beschrieben in ihren Ergebnissen eine LH Ausschüttung in vivo und in vitro nach Zusatz des natürlichen wie des synthetischen LHRH (55b).

Im Gegensatz zur täglichen LHRH Zugabe ließ sich bei einmaligem LHRH Zusatz und dann ständiger Verdünnung keine eindeutige Stimulierung der LH Freigabe nachweisen.
Nur im Konzentrationsbereich von 0,5 µg/ml LHRH fand sich eine geringfügige Stimulierung gegenüber dem Kontrollwert.
Bei den Konzentrationen 1,5 und 2,5 µg/ml LHRH lag die Gesamtausschüttung deutlich unter der des Leerwertes.
Bezüglich der täglichen Ausschüttung von LH läßt sich in den Versuchsansätzen mit einmaliger Zugabe von LHRH im Gegensatz zu täglicher Zugabe von LHRH (Versuch 2) feststellen, daß nach dem zweiten Versuchstag keine wesentliche LH Freisetzung mehr stattfindet.
Viele Autoren beschäftigte die Frage, ob außer einem Release von LH LHRH auch eine Neusynthese bewirkt. SCHALLY wies 1972 in Versuchen mit H^3-markiertem Glucosamin eine deutliche Zunahme der Radioaktivität im zu bestimmenden LH nach, was eine Neusynthese von LH bewies (45). LIN und TAKAYASHI vermochten durch Verpflanzung von Hypophysengewebe mit minimalem LH Gehalt in Hoden eine Synthese von LH nachzuweisen. Zugabe von LHRH ergab einen maximalen LH Release, was bewies, daß LHRH sowohl Release wie auch Synthese bewirkte (31).

Mehrere Forscher versuchten die vermutete Synthese mit Proteininhibitoren wie Puromycin zu blockieren (28,29,64). Genauere Untersuchungen erbrachten, daß zur Synthese zwei Schritte nötig sind. Da LH ein Glykoproteid darstellt, ist erstens die Bildung der Polypeptidkette, zum zweiten die Kopplung an den Glykosidanteil erforderlich. JUTISZ, BERAULT et al. vermuteten auf Grund ihrer Versuche eine Beteiligung des LHRH am zweiten Schritt der Synthese (29).
In vorliegender Arbeit wurde in Versuch 4 geprüft, ob bei täglicher LHRH Zugabe eine LH Freigabe auch nach dem fünften Versuchstag bei einer Versuchsdauer von insgesamt 20 Tagen stattfindet. Die ersten fünf Versuchstage und Versuch 2 sind direkt vergleichbar, da identische Versuchsbedingungen herrschten. Bei Betrachtung der Gesamtausschüttung von LH im jeweiligen Konzentrationsbereich zeigen beide Versuche identische Ausschüttungen. Im Gegensatz zu Versuch 2 konnte man im Versuch 4 nach dem dritten Versuchstag keine nennenswerte tägliche LH Freigabe feststellen. Dies könnte jedoch mit der initial höheren Freisetzung von LH zu begründen sein. Es zeigte sich, daß 88 - 93% der Gesamtausschüttung von LH bereits in den ersten fünf Tagen erfolgte. Somit konnte bewiesen werden, daß nach dem fünften Versuchstag keine LH Freisetzung mehr stattfindet.
STEINBERGER erklärte die fehlende Stimulation der LH Synthese in Versuchen über 21 Tage damit, daß durch die lange Kultivierung eine Fibroblastenüberwucherung stattgefunden hat, oder durch die zu häufige Zufuhr von LHRH eine zu hohe Konzentration erreicht wurde und somit ein cytotoxischer Effekt entstand (58). TIXIER-VIDAL et al. gelangten zu demselben Ergebnis, indem sie bei Hypophysenkulturen über zwei Monate eine Zunahme des LH Release nur in den ersten fünf Tagen beobachten konnten (59).
Die von HELLER durchgeführten in vivo Untersuchungen ergaben wie die in vorliegender Arbeit bei in vitro Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen eine LHRH-dosisbezogene LH Freisetzung. Er ermittelte bei Bestimmung der Dosis-Wirkungs Beziehung eine für die LH Freigabe optimale Dosis, über einer bestimm-

ten Konzentration trat dann eine Inhibierung auf (23). Da in den bisherigen Versuchen die höchste Absolutmenge am ersten Tag ausgeschüttet wurde, sollte eine kinetische Studie über 36 Stunden den genauen Zeitpunkt des LH Release aufzeigen. Der höchste prozentuale Release trat in den ersten vier Stunden auf; wie den Abbildungen 41 und 42 zu entnehmen ist, wurde beim Leerwert 65% der Gesamtausschüttung in dieser Zeit, bei der Dosis 0,5 µg/ml LHRH 42% ausgeschüttet. Bezüglich der Gesamtausschüttung über 36 Stunden erfolgte eine signifikante dosisabhängige Steigerung des LH Release bis zu 1,5 µg/ml LHRH; bei 2,5 µg/ml bemerkte man einen Rückgang der Ausschüttungsmenge. HELLER ermittelte bei in vivo durchgeführten kinetischen Untersuchungen das Aktivitätsmaximum von LH im Plasma nach 30 Minuten (23).

Zu den unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführten Untersuchungen über den FSH Release ist zu erwähnen, daß bereits eine Hemmung der FSH Ausschüttung vorzuliegen scheint wo LH noch maximal stimuliert wird (56). Bei der kinetischen Studie des FSH Release über 36 Stunden erhielt man die höchsten Ausschüttungswerte bei der Dosis 0,5 µg/ml LHRH, während bei 1,5 µg/ml bereits eine Hemmung vorlag. Der LH Release erreichte bei der Konzentrationsstufe 1,5 µg/ml LHRH sein Maximum. Diese Tendenz zeigte sich auch bei den übrigen Versuchen. Man muß feststellen, daß LHRH den LH Release mehr stimuliert als den FSH Release. Zu diesen Ergebnissen gelangte schon SCHALLY unter ähnlichen Versuchsvoraussetzungen. Der LH Release steigerte sich innerhalb eines gewissen Konzentrationsbereiches von LHRH, während der FSH Release eine Dosisabhängigkeit aufwies. Er erreichte bei einer gewissen Grenzdosis ein Plateau und war durch höhere Konzentrationen nicht mehr zu steigern (45). Auch SPONA erhielt nach Zusatz von LHRH in vivo wie in vitro eine höhere LH als FSH Ausschüttung. Er nimmt zwei Rezeptoren unterschiedlicher Struktur in der Hypophyse an, wobei LHRH eine größere Affinität zu dem Rezeptorsystem zeigt und den LH Release bewirkt (57).

Die Frage wie sich ein Zusatz von verschiedenen Substanzen auf den LH Release auswirkt, wurde anhand von Versuchen mit Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ genauer untersucht. Bekannt ist, daß die Prostaglandine einen Einfluß auf die Hypophysenvorderlappenhormone ausüben. Es wurde ein Eingriff in den Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse angenommen.
HARMS, OJEDA und McCANN bewiesen 1974 eine Gonadotropinausschüttung in Anwesenheit von PG_{E1} und PG_{E2} (19). Durch deren direkte Injektion in den dritten Ventrikel und in die Hypophyse erhielten sie ebenfalls eine LH Ausschüttung (18,19). Bislang bestand aber noch Unklarheit über den eigentlichen Angriffspunkt. ZOR, McCANN et al. vermuteten einen Zusammenhang zwischen Prostaglandinen und zyklischem AMP auf den LH Release (67). CHOBSIENG, NAOR et al. vermochten durch Zugabe eines Anti-LHRH-Serums die Wirkung der Prostaglandine auf die LH Ausschüttung aufzuheben (6).
Mit Inhibitoren der Prostaglandinsynthese, vor allem Indomethazin gelang es OJEDA, HARMS und McCANN in weiteren Untersuchungen die LH Ausschüttung zu blockieren (39).
Auch Acetylsalicylsäure stellt ein starker Inhibitor der Prostaglandinsynthese dar (18,61).
In der vorliegenden Arbeit wurde das Prostaglandin $F_{2\alpha}$ verwandt, bei dem HARMS, OJEDA und McCANN in ihren in vivo Untersuchungen einen geringeren LH Release erhielten als durch Prostaglandin E_1 (18).
In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei gemeinsamer Zugabe von jeweils 0,5 µg/ml LHRH, diese Konzentrationsstufe zeigte in den vorausgegangenen Versuchen den größten LH Release, und von 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ eine Prostaglandin $F_{2\alpha}$ konzentrationsabhängige Steigerung des LH Release stattfand. Bei Zugabe von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ in niedriger Dosierung (0,01 - 0,1 mg PG $F_{2\alpha}$) lag die LH Ausschüttung nur wenig über derjenigen der Kontrollgruppe, sodaß man bei Vergleich mit den vorherigen Versuchen bei alleiniger LHRH Zugabe, wo eine deutliche Stimulierung auftrat, eher von einer Hemmung sprechen kann. Bei Zugabe von 0,5 µg/ml LHRH und 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ also bei einer deutlichen Steigerung

der PG $F_{2\alpha}$-Konzentration trat dann ein deutlicher LH Release gegenüber der Kontrollgruppe auf (Kontrollgruppe 1171 ng/ml = 100%, 0,5 µg/ml LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ 2306 ng/ml = 197%). Es scheint also, daß PG $F_{2\alpha}$ in niedriger Dosierung eher den LH Release durch LHRH bremst, bei hoher Konzentration aber dann doch steigert. Bei Betrachtung der Ausschüttungsdynamik läßt sich feststellen, daß zumindest im Konzentrationsbereich 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ eine tägliche Ausschüttungssteigerung von LH stattfindet, die gegenüber der Kontrollgruppe bis zum fünften Versuchstag reicht.
Zur Klärung der Frage, ob der LH Release unter Zugabe von 0,5 µg/ml LHRH + 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ Folge der Wirkung von PG $F_{2\alpha}$ oder LHRH ist, wurden Versuche durchgeführt bei denen Gruppen gebildet wurden, denen jeweils 0,5 µg/ml LHRH, 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ und gemeinsam PG $F_{2\alpha}$ und LHRH zugesetzt wurden. Dabei zeigte sich nun, daß jede einzelne Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlichen LH Release bewirkt. Den höchsten Release beobachtet man bei Zugabe von 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ (Kontrollgruppe 1827 ng/ml = 100%, 0,5 mg PG $F_{2\alpha}$ 3087 ng/ml = 169%). Es scheint also, als ob im angewandten Konzentrationsbereich ein LH Release sowohl durch LHRH als auch durch PG $F_{2\alpha}$ allein ausgelöst werden kann, und daß die gemeinsame Zugabe von PG $F_{2\alpha}$ und LHRH zwar eine Ausschüttungssteigerung gegenüber der alleinigen Zugabe von LHRH bewirkt, diese Steigerung jedoch Folge des Zusatzes von PG $F_{2\alpha}$ sein dürfte, da ja die alleinige Zugabe von PG $F_{2\alpha}$ überhaupt den höchsten Release aufwies. Weiter ließ sich bei gemeinsamer Zugabe feststellen, daß sich die Ausschüttungsdynamik änderte, so kam es in dieser Gruppe erst am zweiten Versuchstag zur höchsten LH Freigabe und danach beobachtete man eine signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte LH Freigabe.
HELLER und WEBER erhielten 1974 bei ihren in vivo Untersuchungen bei gemeinsamer Zugabe von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ eine höhere LH Ausschüttung als durch LH alleine (24), was mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse übereinstimmt.

Für viele Autoren warf sich die Frage auf, ob die Prostaglandine auch bei alleinigem Zusatz von LHRH immer in Form einer Transmitter-Wirkung am LH Release beteiligt sind. MAKINO, DEMERS und GREEP konnten 1974 nach Zugabe von LHRH eine Abnahme des Glykogengehaltes der Hypophyse und eine Zunahme der Glykogen-Phosphorylase und des zyklischen AMP zeigen. Glykogen mußte folglich als Energiequelle beim Release dienen. In weiteren Untersuchungen konnten sie die gleichen Veränderungen auch nach Zusatz von Prostaglandinen nachweisen (7,33). NAOR et al. bewiesen 1974 in ihren Versuchen, daß zwar bei LHRH als auch bei Prostaglandinen der Release über das Mitwirken des zyklischen AMP ausgelöst wird, die Prostaglandine jedoch nicht unbedingt in Form einer Transmitter-Wirkung für den LH Release nötig sind (37). Sie erhielten nach Zusatz von LHRH keine Erhöhung des Gehaltes an Prostaglandinen oder der Prostaglandinsynthetase.
Auf Grund der in vorliegender Arbeit gewonnenen Ergebnissen ergibt sich, daß bei gemeinsamem Zusatz von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ in niedriger Dosierung (0,01 - 0,1 mg) eher eine Hemmung des durch den LHRH bedingten LH Release vorliegt, daß dann aber bei ansteigender Dosierung von PG $F_{2\alpha}$ eine Zunahme der LH Freigabe erfolgt. Bei alleiniger und gemeinsamer Zugabe von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ in einem bestimmten Konzentrationsbereich zeigte sich, daß LHRH und PG $F_{2\alpha}$ zusammen einen höheren Release bewirkt als LHRH alleine, jedoch auch einen geringeren Release als wenn nur PG $F_{2\alpha}$ zugesetzt wurde. Somit scheint PG $F_{2\alpha}$ allein ein starker Stimulator des LH Release zu sein.
Gemeinsame Zugabe von Acetylsalicylsäure und LHRH zu den Hypophysenkulturen ergab keine signifikante LH Ausschüttung im Vergleich zur Kontrolle. Die Absolutwerte der einzelnen Versuchstage sowie die Gesamtausschüttungsmenge lagen wesentlich niedriger als bei alleiniger Zugabe von LHRH.
Es ist anzunehmen, daß ACS die Ausschüttung von LH bzw. die Funktion des LHRH hemmt. ACS ist bekannt als Antagonist der Prostaglandinsynthese. Da wie bereits erläutert, Prosta-

glandin vermutlich nicht unbedingt zum LH Release nötig ist, muß vorerst noch offen bleiben, ob die hemmende Wirkung der ACS auf dieser Inhibitorfunktion beruht oder auf andere Mechanismen zurückzuführen ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In vorliegender Arbeit wurden Versuche mit Rattenhypophysenkulturen unter der Fragestellung einer Beeinflussung des LH Release durch das synthetische Releasinghormon LHRH 10-6309, Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ durchgeführt.
Die Bestimmung des LH erfolgte mittels Radioimmunoassay.
Das synthetische Releasinghormon LHRH 10-6309 stimulierte im entsprechenden Konzentrationsbereich (0,5 - 1,5 µg/ml LHRH) und bei täglicher Zugabe den LH Release. In höherer Konzentration trat eine Hemmung des LH Release ein.
Nur einmalige Zugabe von LHRH zeigte keine Zunahme des LH Release gegenüber der Kontrollgruppe.
Eine Stimulierung der LH Freisetzung konnte nur bis zum fünften Versuchstag nachgewiesen werden, danach erscheint die Ausschüttungskapazität der Hypophysen erschöpft zu sein.
Die höchste LH Freigabe in allen Versuchen zeigte sich am ersten Versuchstag, tägliche LHRH Zugabe befähigte die Hypophysen LH auch noch nach dem zweiten Versuchstag in wesentlicher Menge freizusetzen. Eine kinetische Studie über 36 Stunden ergab, daß unter LHRH in den ersten vier Versuchsstunden 42 - 47% der Gesamtausschüttung frei werden.
Gemeinsame Zugabe von LHRH und Acetylsalicylsäure ergab bei steigender Dosierung von ACS eine Reduzierung des LH Release gegenüber alleinigem Zusatz von LHRH, somit hemmt ACS den LHRH induzierten LH Release.
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ scheint ein starker Stimulator der LH Freigabe zu sein. Alleiniger PG $F_{2\alpha}$ Zusatz führte zu einem höheren Release als wenn nur LHRH allein zugegeben wurde, übertraf jedoch auch gleichzeitig den Release, der bei gemeinsamem Zusatz von LHRH und PG $F_{2\alpha}$ erreicht wurde.

7. LITERATURLISTE

1 BABA, Y., MATSUO, H., SCHALLY, A. V.: Structure of the Porcine LH-And FSH-Releasing Hormone. II. Confirmation Of the Proposed Structure By Convential Sequential Analyses.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 459 - 463 (1971)

2 BLOBEL, R. und H. D. SCHLUMBERGER: Über die zentrale Steuerung der weiblichen Gonadenfunktion. Übersicht und eigene Untersuchungen.
Med. Welt 51, 3132 - 3141 (1967)

3 BOWERS, C. Y.: Biological Evidence that Separate Hypothalamic Hormones Release the Follicle Stimulating and Luteinizing Hormones.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 20 - 26 (1973)

4 CAMPBELL, H. J., FEUER, G., HARRIS, G. W.: The effect of intrapituitary infusion of median eminence and other brain extracts on anterior pituitary gonadotrophic secretion.
J. Physiol. (Lond.) 170, 474 - 486 (1964)

5 CAMPBELL, H. J., FEUER, G., GARCIA, J., HARRIS, G. W.: The infusion of brain extracts into the anterior pituitary gland and the secretion of gonadotrophic hormone.
J. Physiol. (Lond.) 157, 30 - 31 (1961)

6 CHOBSIENG, P., NAOR, Z., KOCH, Y., ZOR, U., and LINDNER, H. R.: Stimulatory effect of prostaglandin E_2 on LH release in the rat: evidence for hypothalamic site of action.
Neuroendocrinology 17, 12 - 17 (1975)

7 DEMERS, L. M., MAKINO, T., and GREEP, R. O.: Factors influencing pituitary glykogen metabolism and gonadotrophic hormone release
II A role of prostaglandins
Fertility and Sterility 25/10, 878 - 884 (1974)

8 DHARIWAL, A. P. S., NALLAR, R., BATT, M., McCANN, S. M.: Separation of Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Factor.
Endocrinology 76, 290 - 294 (1964)

9 DOUGLAS, W. W., and POISNER, A. M.: Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis.
J. Physiol. (Lond.) 172, 1 - 18 (1964)

10 EAHINS, K. E., FREDHOLM, H. F. B., HIGBERG, B., and VEIGE, S.: On the Prostaglandin Inhibitory Action of Polyphloretin Phosphate.
Advances in the Biosciences 9; International Conference on Prostaglandins 135 - 138 (1972)

11 ENDRÖCZI, E., HILLARD, J.: Luteinizing hormone releasing activity in different parts of rabbit and dog brain.
Endocrinology 77, 667 - 673 (1965)

12 FAWCETT, C. P., REED, M., CHARLTON, H. M., HARRIS, G. W.: The purification of luteinizing hormone releasing factor with some observations on its properties.
Biochem. J. 106, 229 - 236 (1968)

13 FLERKO, B.: The Central Nervous System and the Secretion and Release of LH and FSH.
On Advances in Neuroendocrinology Nalbandov, A., Ed.
Univ. of Illinois Press, Urbana, III., 1963 p. 211

14 GEIGER, R., KÖNIG, W., WISSMANN, H., GEISER, U. and ENZMANN, F.; Farbwerke Hoechst: Synthesis And Characterisation Of A Decapeptide Having LH-RH/FSH-RH Activity.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 767 - 773 (1971)

15 GUILLEMIN, R., ROSENBERG, B.: Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: A study with combined tissue cultures.
Endocrinology 57, 599 - 607 (1955)

16 GUILLEMIN, R., YAMAZAKI, E., JUTISZ, M., SAKIZ, E.: Présence dans un extrait de tissue hypothalamiques d'une substance stimulant la secretion de l'hormone hypophysaire thyreotrope (TSH). Premiere purification par filtration sur le Sephadex.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 255, 1018 - 1020 (1962)

17 HALASZ, B., PUPP, L., UHLARIK, S.: Hypophysiotrophic area in the hypothalamus.
J. Endocr. 25, 147 - 154 (1962)

18 HARMS, P. G., OJEDA, S. R., McCANN, S. M.: Prostaglandin Involvement in Hypothalamic Control of Gonadotropin and Prolactin Release.
Science 181, 760 - 761 (1973)

19 HARMS, P. G., OJEDA, S. R., and McCANN, S. M.: Prostaglandin induced release of pituitary gonadotropins: central nervous system and pituitary sites of action.
Endocrinology 94/5, 1459 - 1464 (1974)

20 HARRIS, G. W.: Electrical stimulation of the Hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohypophysis.
J. Physiol. (Lond.) 107, 418 -429 (1948)

21 HARRIS G. W.: On Neural Control of the Pituitary Gland.
Arnold, London 1955

22 HARRIS, G. W., JACOBSOHN, D.: Functional grafts of the anterior pituitary gland.
Proc. Roy. Soc. B 139, 263 - 276 (1952)

23 HELLER, S.: Nachweis und biologische Charakterisierung von menschlichen Gonadotropin-Releasing-Aktivitäten
Fortschr. Geb. Gynäk. 46, 146 - 214 (1972)

24 HELLER, S. and WEBER, H.: Influence on LH release by prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the rat.
Acta Endocr. (UBH) 75/sep, (84/27) (1974)

25 HOHLWEG, H. und K. JUNKMANN: Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Klin. Wschr. 11. 321 (1932)

26 IGARASHI, M., McCANN, S. M.: A hypothalamic follicle stimulating hormone-releasing-factor.
Endocrinology 74, 446 - 452 (1964)

27 JOHNSON, D. C.: Hypophysial LH release in androgenized female rats after administration of sheep brain extracts.
Endocrinology 72, 832 - 836 (1963)

28 JUTISZ, M. and PALOMA DE LA LLOSA, M.: Studies on Release of Follicle-Stimulating Hormone in Vitro from Rat Pituitary Glands Stimulated by Hypothalamic Follicle-Stimulating Hormone-Releasing Factor.
Endocrinology 81, 1193 - 1202 (1967)

29 JUTISZ, M., BERAULT, A., NOVELLA, M. A., CHAPEVILLE, F.: Sur le mêchanisme d'action du facteur hypothalamique LRF in vitro.
C. R. Acad. Sci. Paris 263, 664 - 667 (1966)

30 LABHETSWAR, A. P.: Effects of Prostaglandin F_2 on Pituitary Luteinizing Hormone Content of Pregnant Rats: A Possible Explanation For The Luteolytic Effect.
Journal of reproduction and fertility, Oxford 23, 155 - 159 (1970)

31 LIN, Y. C., TAKAYASHI, M. and SUZUKI, Y.: Stimulatory action of ovine LH releasing factor on synthesis of luteinizing hormone (LH) demonstrated by the rat intratesticular test system.
Endocr. Jap. 19/2, 145 - 149 (1972)

32 MATSUO, H., BABA, Y., NAIR, A., ARIMURA, A., SCHALLY, A. V.: Structure of the Porcine LH-and FSH-Releasing Hormone. I. The Proposed Amino Acid Sequence
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334 - 1339 (1971)

33 MAKINO, T., DEMERS, L. M., and GREEP, R. O.: Factors influencing glycogen metabolism and gonadotrophic hormone release. I Luteinizing hormone releasing hormone
Fertility and Sterility 25/10, 872 - 877 (1974)

34 McCANN, S. M.: A hypothalamic luteinizing-hormone-releasing-factor.
Amer. J. Physiol. 202, 395 - 404 (1962)

35 McCANN, S. M., TALEISNIK, S. and FROEDMAN, H. M.: LH-releasing activity in hypothalamic extracts.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 432 - 434 (1960)

36 MITTLER, J. C., ARIMURA, A., and SCHALLY, A. V.: Release and Synthesis of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Pituitary Cultures in Response to Hypothalamic Preparations. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1321 - 1325 (1970)

37 NAOR, Z., KOCH, Y., BAUMINGER, S. and ZOR, K.: Action of luteinizing hormone releasing hormone and synthesis of prostaglandin in the pituitary gland. Prostaglandins 9/2, 211 - 219 (1975)

38 NIKITOVITCH-WINER, M. B.: Induction of ovulation in rats by direct infusion of median eminence extracts. Endocrinology 70, 350 - 358 (1962)

39 OJEDA, S. R., HARMS, P. G., and McCANN, S. M.: Effects of Inhibitors of Prostaglandin Synthesis on Gonadotropin Release in the Rat. Endocrinology 97/4, 843 - 853 (1975)

40 PHARRIS, B. B. and WYNGARDEN, L. J.: The effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the progestagen content of ovaries from pseudopregnant rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, 92 - 94 (1969)

41 PIACSEK, B. E., MEITES, J.: Effects of castration and gonadal hormones on hypothalamic content of luteinizing hormone releasing factor (LRF). Endocrinology 79, 432 - 439 (1966)

42 RAMIREZ, V. D., and SAWYER, C. H.: Advancement of puberty in the female rat by estrogen. Endocrinology 76, 1158 - 1168 (1965)

43 RAMIREZ, V. D., NALLAR, R., McCANN, S. M.: Purification of luteinizing hormone releasing-factor from beef hypothalamus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 1072 - 1076 (1964)

44 RATNER, A.: Stimulation of luteinizing hormone release in vitro by dibutyryl-cyclic-AMP and theophylline.
Life Sciences 9, 1221 - 1226 (1970)

45 REDDING, T. W., SCHALLY, A. V., ARIMURA, A., MATSUO, H.: Stimulation of Release and Synthesis of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) in Tissue Cultures of Rat Pituitaries in Response to Natural and Synthetic LH and FSH Releasing Hormone.
Endocrinology 90, 764 - 770 (1972)

46 SAFFRAN, M., SCHALLY, A. V.: Release of corticotropin by anterior pituitary tissue in vitro.
Cand. Biochem. 33, 408 - 415 (1955)

47a SAMLI, M. H., and GESCHWIND, I.: Some Effects of the Hypothalamic Luteinizing Hormone Releasing Factor on the Biosynthesis and Release of Luteinizing Hormone.
Endocrinology 81, 835 - 848 (1967)

47b SAMLI, M. H., and GESCHWIND, I.: Some Effects of Energy-Transfer or K^+-Enhanced Media on the Release of Luteinizing Hormone (LH) from the Rat Pituitary Gland in Vitro.
Endocrinology 82, 225 - 231 (1967)

48 SANDOZ, J., SCHALLY, A. V., SCHRÖDER, H. G., REDDING T. W., HEPTNER, W., and VOGEL, H. G.: Pharmacological Characteristics of a Synthetic Releasing Hormone: LH-FSH-RH (Hoe 471) Part I: Release of Luteinizing Hormone.
Arzneimittelforschung 22. Nr. 15, 1718 - 1721 (1972)

49 SATO, T., HIRONO, M., IJUJO, T., PESAKA, T., TAYA, K., IGARASHI, M.: Direct action of prostaglandins on the rat pituitary.
Endocrinology 96/1, 45 - 49 (1975)

50 SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y.: In vitro and in vivo stimulation of the release of LH.
Endocrinology 75, 312 - 320 (1964)

51a SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y.: Purification of Luteinizing Hormone Releasing Factor from bovine Hypothalamus.
Endocrinology 75, 608 - 614 (1965)

51b SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y., KUROSHIMA, A., ISHIDA, T., REDDING, T. W., KASTIN, A. J.: Proceeding of the XXIIIrd International Congress of Physiological Sciences, Tokyo,
Excerpt. Med. International Congress Sciences No. 87, 1965, 275

52 SCHALLY, A. V., SAITO, T., ARIMURA, A., MÖLLER, E. E., BOWERS, C. Y., and WHITE, W. F.: Purification of follicle-stimulating-hormone-releasing-factor from bovine hypothalamus.
Endocrinology 79, 1087 - 1094 (1966)

53a SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y., WHITE, W. F., COHEN, A. I.: Purification and in vivo and in vitro Studies with Porcine Luteinizing Hormone-Releasing-Factor LRF. Endocrinology 81, 77 - 87 (1967)

53b SCHALLY, A. V., MOLLER, E. E., ARIMURA, A., BOWERS, C. Y., SAITO, T., REDDING, T. W., SAWANO, S., PIZZOLATO, P.: Releasing factors in human hypothalamic and neurohypophyseal extracts. J. Clin. Endocr. and Metab. 27, 755 - 762 (1967)

54 SCHALLY, A. V., and KASTIN, A. J.: The Role of Sex Steroids, Hypothalamic LH-Releasing Hormone and FSH-Releasing Hormone in the Regulation of Gonadotropin Secretion from the Anterior Pituitary Gland. In Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology, Briggs, M. H., Ed. Acad. Press, Lond. 1970, p. 42

55a SCHALLY, A. V., ARIMURA, A., KASTIN, A. J.: Gonadotropin Releasing Hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing-and follicle-stimulating hormones. Science 173, 1036 - 1038 (1971)

55b SCHALLY, A. V., KASTIN, A. J., ARIMURA, A.: Hypothalamic Follicle-Stimulating-Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH-Regulating-Hormone): Structure, Physiology And Clinical Studies. Fertility and Sterility 22, 703 - 721 (1971)

55c SCHALLY, A. V., BABA, Y., ARIMURA, A., REDDING, T. W.: Evidence for Peptide Nature of LH and FSH-Releasing Hormones. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 50 - 56 (1971)

55d SCHALLY, A. V., ARIMURA, A., BABA, Y., NAIR, R. M. G., MATSUO, H., REDDING, T. W., DEBELJUK, L.: Isolation and Properties of the FSH-and LH-Releasing Hormone.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393 - 399 (1971)

56 SEYERLE, D.: Untersuchungen über die Wirkung von LHRH 10-6309 auf die Freisetzung von FSH aus Rattenhypophysenkulturen und Beeinflußung durch Acetylsalicylsäure und Prostaglandin $F_{2\alpha}$.
Inauguraldissertation 1979 Universität Tübingen

57 SPONA, J.: LHRH stimulated gonadotropin release mediated by two distinct pituitary receptors.
Febs Letters (Amst.) 35/1, 59 - 62 (1973)

58 STEINBERGER, A., CHOWDHURY, M., STEINBERGER, E.: Effect of Repeated Replenishment of Hypothalamic Extract on LH and FSH Secretion in Monolayer Cultures of Rat Anterior Pituitary Cells.
Endocrinology 92/1, 12 - 17 (1973)

59 TIXIER-VIDAL, A., KERDELHUE, B. and JUTISZ, M.: Kinetics of release of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) by primary cultures of dispersed rat anterior pituitary cells. Chronic effect of synthetic LH and FSH releasing hormone.
Life Sci. 121/II, 499 - 509 (1973)

60 TÖRÖK, B.: Lebendbeobachtung des Hypophysenkreislaufes an Hunden.
Acta. morph. Acad. Sci. hung. 4, 83 - 89 (19547

61 VANE, J. R.: Inhibition of Prostaglandin Biosynthesis as the Mechanism of Action of Aspirinlike Drugs.
Advances in the Biosciences 9; International Conference on Prostaglandins 395 - 411 (1972)

62 WAKABAYASHI, K., KAMBERI, J. A., and McCANN, S. M.: In Vitro Response of the Rat Pituitary to Gonadotropin-Releasing Factors and to Ions. Endocrinology 85, 1046 - 1056 (1968)

63 WAKABAYASHI, K., RODRIGUES, J. A., TAMACHI, B.-J., and McCANN, S. M.: In Vitro Effect of Hypothalamic Extract and other Stimulating Agents on Glucose Oxidation and Luteinizing Hormone (LH) Release from the Rat Anterior Pituitary Glands. Endocrinology 90, 690 - 699 (1972)

64 WATANABE, S., DHARIWAL, A. P. S., and McCANN, S. M.: Effect of Inhibitors of Protein Synthesis on the FSH-Releasing Action of Hypothalamic Extracts in Vitro. Endocrinology 82, 674 - 684 (1968)

65 WESTMAN, A. und JACOBSOHN, D.: Endokrinologische Untersuchungen an Ratten mit durchgetrenntem Hypophysenstiel. 3. Mitteilung: Ober die luteinisierende Wirkung des Follikelhormons. Acta. Obstret. Scand. (Schw.) 18, 115 (1938)

66 WHITE, W. F.: Hypophysiotrophic Hormones of the Hypothalamus. Meites, J. Ed. Williams & Wilkins (Baltimore) p. 248 1970

67 ZOR, K., LAMPRECHT, S. A., KONEHO, T., SCHNEIDER, H. P. G., McCANN, S. M., FIELD, J. B., TSAFRINI, A., and LINDNER, H. R.: Functional Relations Between Cyclic AMP, Prostaglandins, and Luteinizing Hormone in Rat Pituitary and Ovary. Advances in Nucleotide Research 1, 503 - 520 (1972)

Dank

Der experimentelle Teil der vorgelegten Dissertation wurde im Endokrinologischen Labor und im Chromosomenlabor der Universitätsfrauenklinik Tübingen durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. S. Heller für die Stellung des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Endokrinologischen Labor und insbesondere für seine Bereitschaft theoretische und technische Probleme zu besprechen, die im Verlauf der Arbeit anfielen.

Herrn Dr. med. Hole für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Chromosomenlabor und Anleitung zur praktischen Ausführung der Versuche.

Herrn W. Eberle, Chem. Laborant, für bereitwillige Zurverfügungstellung von Geräten und Anleitung und Hilfe bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Ergebnisse, sowie allen technischen Assistentinnen des Endokrinologischen Labors und Chromosomenlabors der Universitätsfrauenklinik Tübingen für die Beratung und Hilfestellung bei der praktischen Durchführung der Versuche.

LEBENSLAUF

Am 23. August 1951 wurde ich, Irene Schäfer, als Tochter des Masch. Ing. Otto Schäfer und seiner Ehefrau Agnes geborene Armbruster in Stuttgart geboren.

Von 1958 – 1962 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart – Degerloch, danach wechselte ich auf das Fanny – Leicht Gymnasium in Stuttgart – Vaihingen über. Am 18.6.1970 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Im Sommersemester 1971 bestand ich die naturwissenschaftliche, im Wintersemester 1972/73 die ärztliche Vorprüfung.

Am 1. Juli 1976 legte ich das Ärztliche Staatsexamen ab. Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich am Kreiskrankenhaus Calw (Chirurgie und Innere Medizin) und an den Städt. Krankenanstalten Ludwigsburg (Geburtshilfe und Gynäkologie) ab.

Zur Zeit bin ich als Assistenzärztin an der Landesklinik Nordschwarzwald tätig.

Den experimentellen Teil der vorgelegten Dissertation führte ich seit Winter 73/74 im Endokrinologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. S. Heller durch.